



# Etude de p76, une nouvelle protéine mannose-6-phosphate : caractérisations biochimiques, localisation lysosomale et approche de la fonction.

Anaïs Jensen

## ► To cite this version:

Anaïs Jensen. Etude de p76, une nouvelle protéine mannose-6-phosphate : caractérisations biochimiques, localisation lysosomale et approche de la fonction.. Biochimie [q-bio.BM]. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2007. Français. NNT : . tel-00157044

**HAL Id: tel-00157044**

**<https://theses.hal.science/tel-00157044>**

Submitted on 25 Jun 2007

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ JOSEPH FOURIER GRENOBLE I  
Ecole Doctorale Chimie et Sciences du Vivant

## **THÈSE**

pour l'obtention du grade de

**Docteur de l'Université Joseph Fourier Grenoble I**

Discipline : Biologie Cellulaire

Présentée et soutenue publiquement par

**Anaïs JENSEN**

Le 26 avril 2007

**Etude de p76, une nouvelle protéine mannose-6-phosphate :  
caractérisations biochimiques, localisation lysosomale  
et approche de la fonction.**

**Co-direction de thèse**

M. Jérôme GARIN

Mme Agnès JOURNET

**Membres du jury :**

M. Franz BRUCKERT	Président
M. Bruno GASNIER	Rapporteur
M. Thierry LEVADE	Rapporteur
M. Michel SATRE	Examineur

Thèse préparée au sein du Laboratoire d'Etude de la Dynamique des Protéomes (EDyP)  
U880 INSERM/CEA/UJF  
iRTSV/ CEA-Grenoble







# REMERCIEMENTS

**J**e remercie les membres du jury : Monsieur Franz Bruckert d'en avoir accepté la présidence, Messieurs Bruno Gasnier, Thierry Levade et Michel Satre d'avoir accepté de juger mon travail de thèse et de l'avoir fait avec beaucoup de sérieux. J'espère que la poursuite du travail sur p76 sera guidée par les remarques très intéressantes apportées durant la soutenance.

**J**e tiens à remercier Jérôme Garin de m'avoir accueillie durant ces trois années et demie. Je garderai le souvenir de ton optimisme légendaire, qui est la touche indispensable pour maintenir le cap dans les aléas de la thèse.

**U**n grand merci à Agnès Journet, qui m'a aidée au quotidien dans la gestion du projet « p76 ». Tu as été une personne très précieuse pour le bon déroulement ma thèse : ta rigueur m'a beaucoup appris et c'est une qualité importante à transmettre à un jeune chercheur et c'est grâce à elle que nos résultats sont de qualité. J'ai aussi apprécié d'avoir pu compter sur tes connaissances sur la voie endocytaire et les lysosomes : elles ont le mérite de la clarté et c'était très rassurant de pouvoir compter sur ce savoir. Enfin, je garderai le souvenir de ton soutien et ta compréhension dans mes nombreux moments de remise en question et de doute...

**J**e remercie également Agnès Chapel, avec ses mains en or massif et sa vivacité communicative ! Je te suis vraiment reconnaissante de toutes ces heures passées à manipuler p76, cela a été une contribution très importante de ma thèse. J'ai également beaucoup apprécié la vie quotidienne au labo à tes côtés ; nos discussions, ton rire vont me manquer !

**J**e remercie tous les gens du laboratoire de Chimie des Protéines, devenu le laboratoire bien nommé « EDyP » ; il deviendrait presque une seconde famille ! Je vous souhaite à tous une bonne continuation, en maintenant la bonne ambiance qui vous caractérise, tout en étant au top de la protéomique française !



**U**n grand merci plus particulier à ceux qui m'ont aidée durant la thèse : Magali Chemali, ma collègue de bureau, souvent partie à Namur, qui revenait avec tous ces échantillons, fruits d'un labeur impressionnant ! Je te suis reconnaissante d'avoir pu en bénéficier ; ils ont apportés des résultats clés pour ma thèse. J'ai été ravie de passer quelques jours à Namur en ta compagnie, dans ce laboratoire historique, et de rencontrer les collègues belges que j'ai trouvé fort sympathiques : Isabelle Hamer, Marielle Boonen et tous les autres. Je remercie également Michel Jadot, avec lequel les interactions ponctuelles ont été très enrichissantes.

**J**e remercie également Alain Dupuis et ses connaissances abyssales en biochimie (notamment). J'ai beaucoup appris à tes côtés ! Pour les analyses en spectrométrie de masse, je remercie Lauriane Kuhn, Mathilde Louwagie, Sylvie Kieffer et Magali Court.

**J**e remercie Gérard Brandolin pour son aide pour l'analyse des phospholipides, Didier Grunwald pour son aide sur le microscope confocal, Odile Fihloul pour son aide pour la RNAi. Pour les discussions intéressantes dans une ambiance sympathique, je remercie les « ami...bes ! » du club Endocytose, notamment Laurence Aubry, Gérard Klein et Nelly Benett. Je garderai un très bon souvenir du congrès « Exo-Endocytose » ensemble à Anglet.

**U**n grand merci aussi à toutes les amies, qui représentent un soutien important pendant toute la thèse : Lucie, Alexandra, Marlène, Virginie, Anouk, Peggy, Barbara, Malau, Claire, Emilie, Béatrice, Karine, Agathe, Camille mais aussi les toulousains qui vivent ou ont vécu la même galère !

**E**nfin, un grand merci aussi à mon Thibault, qui a fêté les hauts et supporté les bas de cette longue épreuve doctorale, ainsi que ma famille et ma belle-famille, qui m'ont fait l'honneur de leur soutien le jeudi 26 avril 2007.





## Résumé

La protéine p76 (« hypothetical protein LOC196463 ») a été identifiée au laboratoire lors d'une analyse protéomique ciblant les protéines mannose-6-phosphate de lignées cellulaires humaines U937 et MCF7. Ce rapport de thèse présente l'étude de cette protéine concernant certaines de ses caractéristiques biochimiques, sa localisation intracellulaire et l'approche de sa fonction. Ainsi, nous avons mis en évidence la présence de 6 N-glycosylations, ainsi que la présence effective de sucres mannose-6-phosphate. Une maturation protéolytique des précurseurs de la forme humaine et murine de p76 a été observée ; les chaînes issues de ces clivages ont été en partie caractérisées à l'aide des anticorps développés au laboratoire. L'étude de sa localisation intracellulaire par immunofluorescence et par fractionnements subcellulaires réalisés sur du foie de souris indique clairement que p76 est localisée dans les lysosomes. Enfin, p76 ayant une homologie de séquence avec une phospholipase B nouvellement caractérisée de *Dictyostelium discoideum*, des tests fonctionnels ont été mis en œuvre pour détecter une telle activité pour la protéine recombinante hp76-myc, mais sans succès. En revanche, une expérience de fat blot a montré que hp76-myc se lie à la cardiolipine, un phospholipide particulier des membranes mitochondriales et bactériennes.

## Summary

The protein « p76 » (« hypothetical protein LOC196463 ») was identified some years ago in our laboratory during the course of a proteomic analysis of mannose-6-phosphate proteins purified from human cell lines. The present thesis describes the biochemical characterisation and the intracellular localisation of p76, as well as some functional tests carried out with recombinant p76. We demonstrated that human p76 sequence bears 6 N-glycosylations and that mannose-6-phosphate sugars were present. Proteolytic maturation of human and murine p76 precursors was observed; a few intermediate forms were partially characterised thanks to anti-p76 antibodies which were developed in the laboratory. Most importantly, we were able to demonstrate the lysosomal localisation of this protein by both immunofluorescence and sub-cellular fractionation of mouse liver homogenates. As p76 shows a significant sequence homology to a recently cloned phospholipase B from *Dictyostelium discoideum*, some functional tests were performed, but no phospholipase activity could be detected with recombinant hp76-myc. However, a fat blot experiment showed that hp76-myc binds cardiolipin, a particular phospholipid enriched in mitochondrial and bacterial membranes.

**Mots-clés** : localisation lysosomale, mannose-6-phosphate, modifications post-traductionnelles, fractionnements subcellulaires, immunofluorescence, protéomique.



## Liste des abréviations

<b>CHAPS</b>	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate
<b>CCM</b>	Chromatographie couche mince
<b>CD-MPR</b>	Récepteur au mannose-6-phosphate cation dépendant
<b>CI-MPR</b>	Récepteur au mannose-6-phosphate cation indépendant
<b>Dd-PLB</b>	Phospholipase B de <i>Dictyostelium discoideum</i>
<b>DMEM</b>	Dubelcco's modified Eagle's medium
<b>ICD</b>	Inclusion-cell disease
<b>IF</b>	Immunofluorescence
<b>IP</b>	Immunoprécipitation
<b>LAMP</b>	Protéine membranaire associée aux lysosomes
<b>MALDI-TOF</b>	Matrix assisted laser desorption/ionisation - time of flight
<b>MPR</b>	Récepteur au mannose-6-phosphate
<b>MVB</b>	Corps multi-vésiculaire
<b>M6P</b>	Mannose-6-phosphate
<b>PA</b>	Acide phosphatidique
<b>PBS</b>	Phosphate-buffered saline
<b>PC</b>	Phosphatidylcholine
<b>PE</b>	Phosphatidyléthanolamine
<b>PG</b>	Phosphatidylglycérol
<b>PI</b>	Phosphatidylinositol
<b>PLA, PLB, PLC, PLD</b>	Phospholipase A, B, C, D
<b>PLA2pp</b>	Phospholipase A2 pancréatique porcine
<b>PNGase F</b>	Peptide : N-glycosidase F
<b>PS</b>	Phosphatidylsérine
<b>RT-PCR</b>	Real-time polymerase chain reaction
<b>RE</b>	Réticulum endoplasmique
<b>sCI-MPR</b>	Récepteur au mannose-6-phosphate cation indépendant soluble
<b>SVF</b>	Sérum de veau fœtal
<b>TGN</b>	Réseau trans-golgien
<b>2D</b>	bidimensionnel



## SOMMAIRE

<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>29</b>
<b>I. LA VOIE ENDOCYTAIRE.....</b>	<b>29</b>
1. Les compartiments de la voie endocytaire.....	30
1.1. Les endosomes précoces.....	31
1.2. Les endosomes de recyclage.....	32
1.3. Les endosomes tardifs.....	32
1.4. Les lysosomes.....	33
2. La dynamique de la voie endocytaire.....	35
3. Les différentes voies d'entrées.....	35
3.1. L'endocytose à récepteurs dépendante de la clathrine.....	35
3.2. L'endocytose via les radeaux lipidiques et les cavéoles.....	36
3.3. La pinocytose.....	37
3.4. La phagocytose.....	38
<b>II. LES LYSOSOMES.....</b>	<b>38</b>
1. Historique.....	39
2. Composants du lysosome.....	39
2.1. Le contenu soluble du lysosome : les hydrolases acides.....	39
2.2. Les protéines membranaires lysosomales.....	40
3. Ciblage des protéines lysosomales.....	44
3.1. Ciblage des protéines M6P.....	44
3.1.1. Le mécanisme de ciblage.....	44
3.1.2. Les récepteurs au M6P.....	45
3.2. Ciblage indépendant des récepteurs au M6P.....	46
3.3. Ciblage des protéines lysosomales membranaires.....	47
4. Fonctions des lysosomes.....	48
4.1. Le catabolisme général.....	48
4.1.1. Processus de dégradation.....	48
4.1.2. Autophagie.....	48
4.2. Autres fonctions des lysosomes.....	50
4.2.1. Fonctions ubiquitaires.....	50
4.2.1.1. Réparation de la membrane plasmique.....	50
4.2.1.2. Implication dans la mort cellulaire.....	50
4.2.2. Fonctions spécialisées.....	52
5. Les maladies lysosomales.....	53
<b>III. IDENTIFICATION DE P76.....</b>	<b>55</b>
1. Données de spectrométrie de masse.....	55
2. Description du gène et de la protéine « p76 ».....	57
<b>IV. LES PHOSPHOLIPIDES ET LES PHOSPHOLIPASES.....</b>	<b>61</b>
1. Structure des phospholipides.....	61
2. Fonction générale des phospholipides.....	63
3. Les phospholipases.....	64
4. Les phospholipases lysosomales.....	65
<b>V. OBJECTIFS DE LA THESE.....</b>	<b>67</b>



## **MATERIEL ET METHODES ..... 71**

<b>I. BIOLOGIE MOLECULAIRE .....</b>	<b>71</b>
1. Clonage .....	71
2. Analyse en Northern blot .....	72
3. Techniques d'interférence à ARN.....	73
<b>II. BIOLOGIE CELLULAIRE .....</b>	<b>74</b>
1. Lignées cellulaires.....	74
2. Transfection et lignées cellulaires transfectées .....	74
3. Analyses en immunofluorescence.....	75
4. Internalisation de hp76-myc par les cellules ICD .....	76
<b>III. BIOCHIMIE .....</b>	<b>77</b>
1. Electrophorèse et coloration des gels.....	77
2. Western blot et overlay .....	77
3. Déshybridation des membranes de Western blot .....	78
4. Purification des anticorps.....	79
5. Fat blots.....	79
6. Détermination de la séquence N-terminale des protéines .....	80
7. Analyse des N-glycosylations.....	80
8. Production et purification de protéines M6P à partir de lignées cellulaires.....	80
9. Production et purification de protéines M6P à partir de cerveau de souris.....	81
10. Production et purification de protéine recombinante FLAG-hp76 .....	81
11. Production de protéine recombinante hp76-myc issue des cellules CHO/hp76-myc .....	82
12. Production de protéine recombinante hp76-myc issue des cellules 293/hp76-myc.....	82
13. Précipitation au sulfate d'ammonium .....	82
14. Concentration des surnageants de culture, changement de tampon .....	82
15. Purification de hp76-myc sur la colonne IMAC d'ion cobalt.....	83
16. Préparation d'une colonne d'affinité hp76-myc .....	83
17. Fractionnements subcellulaires de lignées cellulaires.....	84
18. Fractionnements subcellulaires de foies de souris .....	84
19. Expériences de choc osmotique .....	85
20. Dosages d'activités enzymatiques lysosomales dans les fractionnements subcellulaires de foies de souris.....	85
<b>IV. SPECTROMETRIE DE MASSE ET BIOINFORMATIQUE.....</b>	<b>86</b>
1. MALDI-TOF.....	86
2. LC/MS-MS .....	86
3. Bioinformatique .....	87
<b>V. TESTS ENZYMATIQUES D'HYDROLYSE DE PHOSPHOLIPIDES ET ANALYSE DES PRODUITS DE LA REACTION .....</b>	<b>88</b>
1. Tests enzymatiques en milieu liquide avec l'asolectine.....	88
2. Tests enzymatiques en milieu liquide avec la cardiolipine .....	88
3. Extraction des lipides .....	89
4. Migration en chromatographie en couche mince (CCM).....	89
5. Tests d'activité en milieu liquide avec des substrats fluorescents .....	89
6. Tests avec le NBD-PC .....	90
7. Tests avec le bis-BODIPY PC .....	90
<b>VI. OUTILS DEVELOPPES POUR ETUDIER P76.....</b>	<b>92</b>
1. Lignées cellulaires exprimant p76 recombinante.....	92
2. Fiches d'identité des anticorps anti-p76.....	93
3. Expression et purification de p76 recombinante.....	107
3. 1. FLAG-p76.....	107
3. 2. Production de hp76-myc par les cellules CHO/hp76-myc .....	109





3. 3. Production de hp76-myc par la lignée 293/hp76-myc .....	111
---	-----

## **RESULTATS ET DISCUSSION ..... 115**

### **I. CHAPITRE I : CARACTERISATIONS BIOCHIMIQUES DE P76..... 115**

1. Nombre de glycosylations de hp76.....	115
2. Mannose-6-phosphorylation de hp76.....	117
2. 1. Reconnaissance directe de hp76 par le sCI-MPR .....	117
2. 2. Internalisation de hp76-myc purifiée par des cellules ICD.....	118
3. Maturation de p76 chez la souris et chez l'homme .....	120
3. 1. Maturation de mp76.....	120
3. 2. Maturation intracellulaire de hp76.....	121
3. 3. Maturation de hp76 sécrétée .....	122
3. 3. 1. La protéine recombinante hp76-myc sécrétée subit un clivage majoritaire.....	122
3. 3. 2. La protéine endogène hp76 purifiée à partir des sécrétions de cellules U937 subit un clivage similaire à celui de la protéine recombinante .....	124
3. 3. 3. Les deux chaînes N- et C-terminales sont associées par une liaison non-covalente .....	124
4. Cinétiques de l'expression de hp76 et mp76 dans des cellules transfectées transitoirement.....	126
5. Discussion .....	127
5. 1. Identification de p76 .....	127
5. 2. Tous les sites de N-glycosylations de hp76 sont occupés et certains portent des sucres M6P .....	128
5. 3. p76 subit une maturation protéolytique.....	129
5. 3. 1. mp76 .....	129
5. 3. 2. hp76.....	130
5. 3. 3. Comparaison des formes hp76 et mp76.....	131

### **II. CHAPITRE II : ETUDE DE LA LOCALISATION DE P76..... 133**

1. Localisation tissulaire .....	133
2. Localisation intracellulaire.....	134
2. 1. Localisation de p76 par immunofluorescence.....	134
2. 1. 1. Expression de protéines chimères hp76-GFP ou hp76-myc .....	134
2. 1. 2. Expression de hp76 (sans étiquette).....	136
2. 1. 3. Expression de mp76 (sans étiquette).....	137
2. 1. 4. Conclusions sur l'approche par immunofluorescence .....	138
2. 2. Localisation de mp76 par fractionnements subcellulaires .....	139
2. 2. 1. Distribution de mp76 dans un fractionnement subcellulaire total.....	139
2. 2. 2. Distribution de mp76 dans des gradients de densité .....	140
2. 2. 2. 1. Cas du fragment C-terminal mp27.....	141
2. 2. 2. 2. Cas des fragments N-terminaux de mp76 .....	142
2. 2. 3. Latence .....	143
2. 2. 3. 1. Le fragment C-terminal mp27 est latent .....	143
2. 2. 3. 2. Analyse de la bande contaminante à 29 kDa.....	145
2. 2. 3. 3. Analyse des fragments N-terminaux de mp76.....	145
3. Discussion .....	148
3. 1. p76 est ubiquitaire.....	148
3. 2. p76 est peu abondante .....	149
3. 3. p76 est une protéine lysosomale .....	149

### **III. CHAPITRE III : FONCTION DE P76 ..... 153**

1. Expériences de liaison aux phospholipides.....	153
2. Tests d'activité phospholipase .....	156
2. 1. Tests en milieu liquide et analyse des produits par CCM.....	156
2. 2. Tests en milieu liquide avec des substrats fluorescents .....	160
2. 2. 1. Phosphatidylcholine-NBD .....	161
2. 2. 2. Phosphatidylcholine Bis-Bodipy C11 .....	162



3.	Extinction de hp76 par interférence à ARN .....	164
3. 1.	Extinction de courte durée : duplexes de siRNA .....	164
3. 2.	Extinction de longue durée : transfection avec les shRNA .....	165
4.	Discussion .....	167
4. 1.	Extinction de l'expression de hp76 .....	167
4. 2.	Production et purification de hp76 .....	167
4. 3.	Aucune activité phospholipase A n'a pu être détectée avec hp76 .....	168
4. 4.	hp76-myc lie la cardiolipine .....	169
<b><u>CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....</u></b>		<b><u>173</u></b>
<b>I. CONCLUSION.....</b>		<b>173</b>
<b>II. PERSPECTIVES.....</b>		<b>175</b>
<b><u>BIBLIOGRAPHIE .....</u></b>		<b><u>181</u></b>
<b><u>ANNEXE .....</u></b>		<b><u>201</u></b>
<b>I. ANNEXE 1 : LA PROTEINE RECOMBINANTE FLAG-HP76 PRODUITE EN BACTERIE .....</b>		<b>203</b>
<b><u>PUBLICATION.....</u></b>		<b><u>207</u></b>



## LISTE DES FIGURES

Figure 1. Schéma simple de la voie endocytaire. ....	30
Figure 2. Un endosome précoce. ....	32
Figure 3. Lysosomes observés en microscopie électronique. ....	33
Figure 4. Mécanismes de fusion entre les endosomes tardifs et les lysosomes. ....	34
Figure 5. Clathrine et le complexe AP-2 dans les vésicules couvertes de clathrine. ....	36
Figure 6. Structure des récepteurs au mannose-6-phosphate (MPR). ....	45
Figure 7. Gels 2D des protéines M6P purifiées et position de hp76 déterminée par les analyses en spectrométrie de masse. ....	56
Figure 8. Représentation schématique de la protéine p76 humaine (hp76). ....	58
Figure 9. Alignement des séquences de hp76 (p76 humaine), mp76 (p76 de souris), rp76 (p76 de rat) et de Dd-PLB (phospholipase B de <i>D. discoideum</i> ). ....	60
Figure 10. Phospholipides, sphingomyéline et phospholipases, sphingomyélinase et céramidase. ....	62
Figure 11. Assemblage des phospholipides. ....	63
Figure 12. Structure des substrats fluorescents commerciaux, utilisés pour la détection d'activité phospholipase A1 ou A2. ....	90
Figure 13. Figure récapitulative des anticorps utilisés pour travailler sur les différentes formes de p76. ....	93
Figure 14. Schéma de la zone de la séquence de hp76 reconnue par l'anticorps hp76Ab (domaine hachuré). ....	95
Figure 15. Analyse par Western blot d'échantillons de hp76 avec hp76Ab. ....	95
Figure 16. Schéma de l'épitope ciblé par l'anticorps EST-13Ab sur la séquence de hp76. ....	97
Figure 17. Analyse par Western blot d'échantillons de hp76 avec EST-13Ab. ....	97
Figure 18. Schéma de l'épitope ciblé par l'anticorps Nhp76Ab sur la séquence de hp76. ....	99
Figure 19. Analyse par Western blot d'échantillons de hp76 avec Nhp76Ab. ....	99
Figure 20. Schéma de l'épitope ciblé par l'anticorps Crp76Ab sur hp76, mp76 et de rp76. ....	101
Figure 21. Analyse par Western blot d'échantillons de hp76 ou mp76 avec Crp76Ab. ....	101
Figure 22. Schéma de l'épitope ciblé par l'anticorps Irp76Ab sur mp76 et rp76. ....	103
Figure 23. Analyse par Western blot d'échantillons de mp76 avec Irp76Ab. ....	103
Figure 24. Schéma de l'épitope ciblé par l'anticorps Nmp76Ab sur mp76. ....	105
Figure 25. Analyse par Western blot d'échantillons de mp76 avec Nmp76Ab. ....	105
Figure 26. Analyse des surnageants de culture de cellules CHO hp76-myc. ....	109
Figure 27. Analyse des surnageants de cellules 293/hp76-myc. ....	111
Figure 28. Détermination du nombre de N-glycosylations sur hp76 provenant des protéines M6P de U937. ....	116
Figure 29. Détermination du nombre de N-glycosylations sur hp76-myc sécrétée par la lignée 293/hp76-myc. ....	117
Figure 30. Expérience d'overlay avec le sCI-MPR biotinylé. ....	118
Figure 31. Internalisation de hp76-myc purifiée par des cellules ICD. ....	119
Figure 32. Analyse par Western blot d'échantillons de souris contenant mp76. ....	120
Figure 33. Schéma de maturation de la p76 de souris (mp76) établi à partir des analyses par Western blot. ....	121
Figure 34. Analyse des lysats de lignées surexprimant hp76, par Western blot avec hp76Ab et Crp76Ab. ....	122
Figure 35. Caractérisation des espèces protéiques dérivées de hp76 sécrétée. ....	123
Figure 36. Expérience d'immunoprécipitation à partir des surnageants de 293/hp76-myc. ....	125
Figure 37. Suivi de l'expression transitoire de p76 en cellules HeLa sur 4 jours. ....	127
Figure 38. Schémas de la première étape de maturation commune à hp76 et mp76. ....	132
Figure 39. Etude de la distribution tissulaire de hp76 par Northern blot. ....	133
Figure 40. Analyse en immunofluorescence des cellules HeLa/ hp76-GFP. ....	134
Figure 41. Analyse en immunofluorescence de la lignée stable HeLa/ hp76-myc. ....	136
Figure 42. Analyse en immunofluorescence de cellules HeLa TT hp76. ....	137
Figure 43. Analyse en immunofluorescence de cellules HeLa/ mp76. ....	138



Figure 44. Distribution de mp76 dans un fractionnement subcellulaire total, réalisé par centrifugation différentielle.....	140
Figure 45. Distribution de mp27 dans des gradients de densité, analysée par Western blot par Crp76Ab et Irp76Ab.....	142
Figure 46. Distribution de mp76 dans des gradients de densité, analysée par Western blot par Nmp76Ab. ....	143
Figure 47. Latence de mp27. ....	144
Figure 48. Analyse par Western blot de la bande contaminante à 29 kDa. ....	145
Figure 49. Latence de mp76 observée avec l'anticorps Nmp76Ab.....	147
Figure 50. Fat blots.....	154
Figure 51. Structure de la cardiolipine. ....	155
Figure 52. Analyse en CCM des produits d'un test fonctionnel réalisé avec la lignée CHO/hp76-myc sur des liposomes d'asolectine.....	158
Figure 53. Analyse en CCM des produits d'un test fonctionnel réalisé avec la lignée 293/hp76-myc sur des micelles mixtes de cardiolipine. ....	160
Figure 54. Test d'activité avec un analogue fluorescent de phosphatidylcholine (NBD-PC). ....	161
Figure 55. Test d'activité avec un analogue fluorescent de phosphatidylcholine (bis BODIPY-PC). ....	163
Figure 56. Position des duplexes de siRNA ciblant l'ARNm de hp76.....	164
Figure 57. Transfection de duplexes de siRNA sur des cellules CHO/hp76-GFP. ....	165
Figure 58. Transfection des cellules 293/hp76-myc avec un plasmide de shRNA spécifique de hp76. ....	166
Figure 59. Fractionnement de <i>E. coli</i> /FLAG-hp76.....	203





## **LISTE DES TABLEAUX**

Tableau 1. Les organites dérivés de lysosomes (LRO) .....	52
Tableau 2. Peptides de hp76 identifiés lors des analyses de spectrométrie de masse. ....	57
Tableau 3. Protéines de séquence similaire à p76 humaine. ....	58
Tableau 4. Amorces utilisées en PCR pour cloner p76. Les sites de restriction sont en italique. ....	72
Tableau 5. Duplexes de siRNA ciblant l'ARNm de hp76. La numérotation des nucléotides (nt) commence au premier nucléotide (nt) du cadre ouvert de lecture de hp76. ....	73
Tableau 6. ShRNA ciblant l'ARNm de hp76. La numérotation des nucléotides (nt) commence à au premier nt du cadre ouvert de lecture de hp76.....	73
Tableau 7. Informations sur les anticorps primaires et secondaires utilisés en immunofluorescence. ....	76
Tableau 8. Informations sur les anticorps primaires utilisés Western blot.....	78
Tableau 9. Récapitulatif des lignées surexprimant hp76-myc ou hp76-GFP .....	92
Tableau 10. Indice de confiance des anticorps anti-p76, selon leur utilisation. ....	93
Tableau 11. Résultat du séquençage N-terminal des polypeptides purifiés de surnageant 293/hp76-myc. ....	123
Tableau 12. Analyse en MALDI-TOF des bandes de gel de corps d'inclusion de FLAG-hp76.....	204



## **INTRODUCTION**



# INTRODUCTION

Notre laboratoire s'est intéressé depuis plusieurs années à l'identification de nouvelles protéines de la voie endocytaire de cellules de mammifères, en particulier par l'étude du protéome du phagosome (Garin et al., 2001) et du protéome soluble du lysosome (Journet et al., 2000; Journet et al., 2002). Parmi la liste nominative des protéines identifiées se trouvaient également quelques protéines inconnues identifiées pour la première fois. Ces protéines étant potentiellement de nouveaux acteurs moléculaires du lysosome, il était intéressant de mieux les caractériser. Ainsi, ce travail de thèse a consisté à caractériser la protéine p76, qui faisait partie des protéines nouvellement identifiées. Pour bien situer l'étude de p76 dans son contexte biologique, l'hypothèse de sa localisation lysosomale nous amène à présenter l'ensemble de la voie endocytaire, avec un intérêt plus particulier pour les lysosomes et leurs fonctions. Ensuite, toutes les données connues concernant p76 au commencement de ce travail sont présentées. Enfin, son homologie de séquence avec une phospholipase B de l'amibe *Dictyostelium discoideum* nous amène à faire une présentation générale sur les phospholipides et les phospholipases.

## I. LA VOIE ENDOCYTAIRE

La cellule est capable d'internaliser du fluide, des molécules (hormones, facteurs de croissance, interleukines) et même de grosses particules provenant du milieu extérieur, tout en maintenant son intégrité membranaire. Ce processus est opéré grâce à la machinerie de la voie endocytaire, qui intracellulairement a une fonction de tri et de dégradation. La voie endocytaire consiste en une succession de compartiments membranaires intracellulaires qui fusionnent et bourgeonnent de manière très dynamique et régulée. Elle recycle certains récepteurs, cible le reste pour la dégradation par des hydrolases, puis les molécules simples issues de cette dégradation sont réutilisées par la cellule. La voie endocytaire participe à d'autres processus intracellulaires nécessitant une dégradation ou une maturation de matériel dans un compartiment fermé. C'est le cas, par exemple, de l'autophagie qui permet de dégrader des organites intracellulaires âgés (Yorimitsu and Klionsky, 2005) ou de fonctions

spécialisées de certains types cellulaires, comme l'apprêtement des antigènes dans les cellules présentatrices des antigènes (Watts, 2001).

## 1. Les compartiments de la voie endocytaire

La voie endocytaire est classiquement décrite comme formée de trois types de compartiments : les endosomes précoces, les endosomes tardifs et les lysosomes (Figure 1). Les endosomes sont des plateformes de tri qui séparent les molécules qui doivent être recyclées (par exemple, le récepteur aux lipoprotéines de basse densité (LDL pour Low Density Lipoprotein) (Brown et al., 1983) de celles qui doivent être dégradées (la particule de LDL). Une caractéristique importante de la voie endocytaire est qu'elle est progressivement acidifiée par une V-ATPase. Ce gradient de pH contrôlé est essentiel pour la séparation entre le récepteur et son ligand (Mellman et al., 1986).

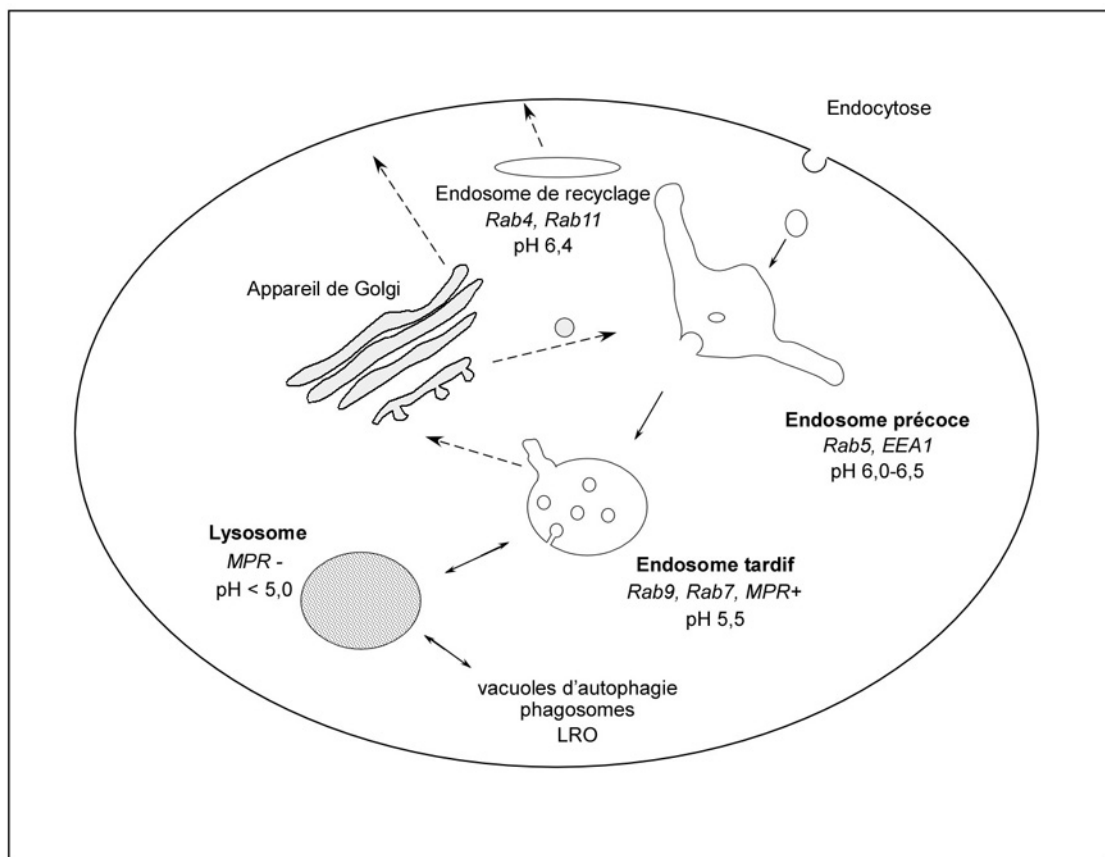


Figure 1. Schéma simple de la voie endocytaire.

Les compartiments de la voie endocytaire sont les endosomes et les lysosomes. Les marqueurs classiques de chaque compartiment sont indiqués en italique. *EEA1* : Early Endosome Antigen 1, *MPR+* : récepteurs au mannose-6-phosphate présents, *MPR-* : récepteurs au mannose-6-phosphate absents, *LRO* : organites dérivés des lysosomes.

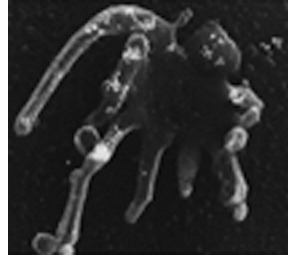
Les récepteurs membranaires qui sont destinés à être dégradés sont signalés par une mono-ubiquitine qu'ils acquièrent lorsqu'ils sont activés sur une lysine de leur queue cytoplasmique. Ce signal déclenche le recrutement d'une machinerie cellulaire capable de séquestrer les récepteurs et de les transporter jusqu'aux lysosomes. (Aguilar and Wendland, 2003; Haglund et al., 2003).

L'étude des compartiments de cette voie s'est faite principalement par des observations morphologiques en microscopie électronique ou en immunofluorescence ou par des fractionnements biochimiques des compartiments. Plus récemment, le développement de la vidéomicroscopie a permis d'étudier la dynamique de cette voie à l'échelle moléculaire (Sonnichsen et al., 2000). Actuellement, il est difficile d'avoir une vision d'ensemble de ces compartiments qui intégrerait les données biochimiques et morphologiques, d'autant que ces données peuvent varier selon le modèle cellulaire. De plus, certains auteurs n'utilisent pas le même terme pour désigner ce qui semble être un même compartiment, ou discutent l'existence d'un compartiment décrit par d'autres. Ainsi, les paragraphes suivants se limitent aux données consensuelles sur les différents compartiments classiquement décrits de la voie endocytaire.

### **1. 1. Les endosomes précoces**

Les lipides et les protéines internalisés se trouvent dans les endosomes précoces quelques minutes après leur internalisation. Les endosomes précoces constituent la première plateforme de tri dans la voie endocytaire. Leur morphologie est remarquable, avec une région globulaire à partir de laquelle émanent de longs tubules (Figure 2) (Gruenberg and Maxfield, 1995). Les molécules à recycler sont dirigées dans les tubules, qui deviennent ensuite des endosomes de recyclage (Lemmon and Traub, 2000). Les marqueurs classiques des endosomes précoces sont la petite protéine G Rab5 (Chavrier et al., 1990), son effecteur EEA1 (pour « Early Endosome Antigen 1 ») (Mu et al., 1995) et le phospholipide phosphatidylinositol 3-monophosphate (PI3P) (Simonsen et al., 1998).





**Figure 2. Un endosome précoce.**

Cinq minutes après endocytose, des LDL couplées à des particules d'or (points blancs), sont présentes dans les endosomes précoces. Image de microscopie électronique « etch-freeze », extraite de (Gruenberg, 2001).

## **1. 2. Les endosomes de recyclage**

Issus du réseau tubulaire de l'endosome précoce, les endosomes de recyclage replacent à la membrane plasmique les récepteurs sans leur ligand ainsi que des lipides, en 10 à 15 minutes (Mellman et al., 1986). Le pH dans ces compartiments est un peu moins acide que celui des endosomes précoces (pH 6,4) (Yamashiro et al., 1984). Les marqueurs classiques de ces compartiments sont les petites protéines G Rab 4 et Rab 11 (Sonnichsen et al., 2000).

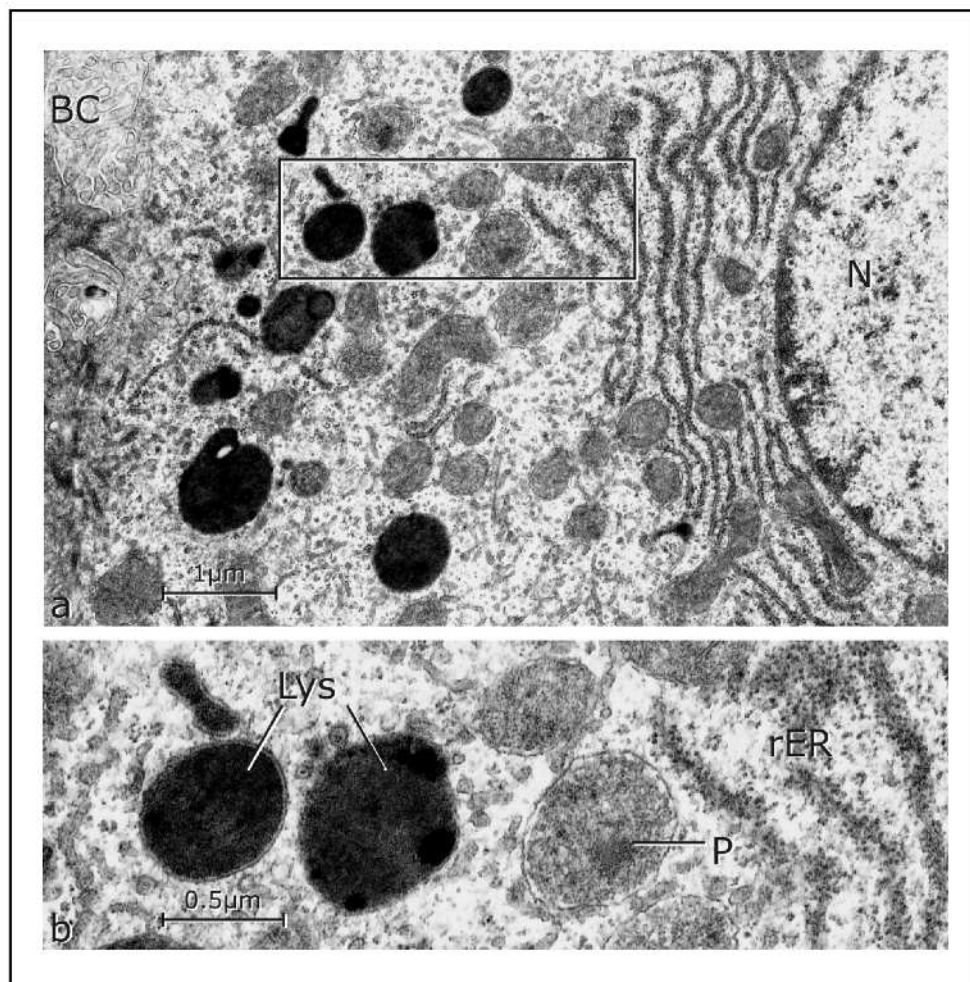
## **1. 3. Les endosomes tardifs**

Dix à quinze minutes après leur internalisation, les molécules destinées à la dégradation ont atteint la deuxième plateforme de tri de la voie endocytaire, les endosomes tardifs. Ces compartiments sont également rejoints par des vésicules qui arrivent de la voie de biosynthèse. La morphologie des endosomes tardifs est remarquable car ils renferment de nombreuses petites vésicules internes. Ainsi, ils apparaissent comme des « corps multi-vésiculaires » (MVB pour Multi-Vesicular Body). La topologie de ces vésicules intraluminales est telle que leur lumière est équivalente au cytoplasme (Gruenberg and Maxfield, 1995). La machinerie à l'origine de la formation des vésicules intraluminales est la machinerie ESCRT (pour « Endosomal Sorting Complex Required for Transport ») et des protéines associées. Cette machinerie commence à être recrutée sur l'endosome précoce, reconnaissant l'étiquette mono-ubiquitine des récepteurs et des molécules présentes sur l'endosome précoce comme les protéines Hrs, Eps15 et STAM, qui recrutent aussi la clathrine (Raiborg et al., 2003). Les endosomes tardifs concentrent dans ces vésicules les lipides et les protéines membranaires à dégrader (les récepteurs porteurs de mono-ubiquitine), mais ils trient également les récepteurs au mannose-6-phosphate (MPR), qui sont recyclés vers le réseau trans-golgien (TGN pour Trans Golgi Network) lorsque leurs ligands, les protéines

lysosomales néosynthétisées, sont dissociés. Les endosomes tardifs sont caractérisés par la présence des protéines Rab9 (Lombardi et al., 1993), Rab 7 (Meresse et al., 1995) et des MPR.

#### 1. 4. Les lysosomes

Dans le schéma classique de la voie endocytaire, les compartiments terminaux sont les lysosomes. Morphologiquement, les lysosomes sont décrits comme des corps denses aux électrons, souvent sphériques ou ovoïdes, entourés d'une membrane et ayant une matrice amorphe, parfois lamellaire (Figure 3). Sous l'effet du pH très acide, les hydrolases adopteraient une forme agrégée à l'origine de cette matrice dense ; celle-ci constituerait un moyen de stockage réversible de ces enzymes (Buckmaster et al., 1988; Jadot et al., 1997).

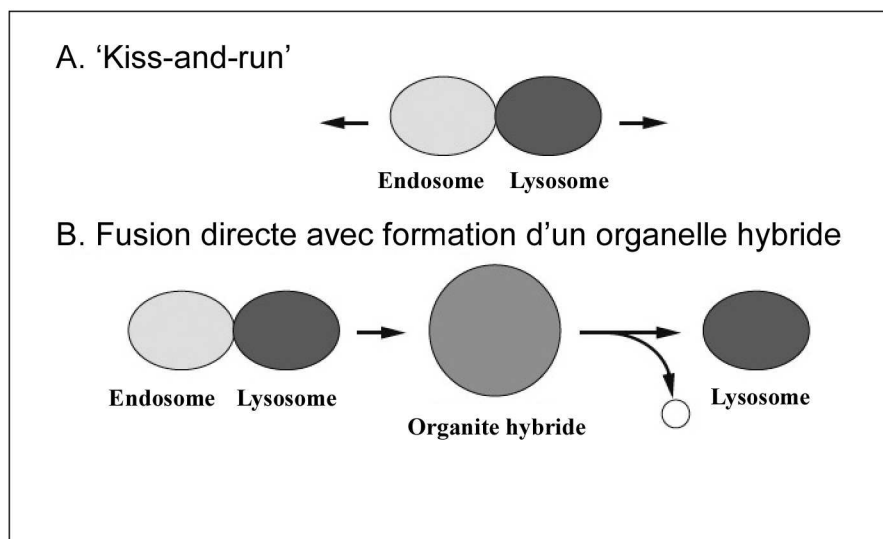


**Figure 3. Lysosomes observés en microscopie électronique.**

(a) Les lysosomes de cet hépatocyte de rat sont les corps denses observés à côté des canalicules biliaires (BC sur la photo). N : noyau. (b) Zoom sur l'aire marquée dans (a) : on distingue la membrane limitante des lysosomes et la matrice dense et amorphe à l'intérieur (Lys). P : peroxysome, rRE : Réticulum endoplasmique rugueux. Les barres représentent 1 μm (A) et 0,5 μm (B). (Figure issue de (Saftig, 2005) avec la permission de R. Lullmann-Rauch)

La dégradation par les hydrolases lysosomales des molécules qui arrivent de la voie endocytaire a lieu dans un compartiment tardif endo-lysosomal de densité intermédiaire qui correspond à la fusion entre un endosome tardif et un lysosome (Mullock et al., 1998). Ce compartiment comporte les glycoprotéines membranaires LAMPs, les marqueurs des endosomes tardifs (les MPR) et des lysosomes (les hydrolases lysosomales). Le seul critère qui distingue vraiment les endosomes tardifs des lysosomes « denses » est l'absence des MPR (Griffiths, 1996).

Il existe principalement deux théories concernant le mécanisme de mélange des contenus du compartiment tardif endo-lysosomal : l'une, dite de « kiss and run », propose que les deux vésicules ne fusionnent pas totalement et échangent, par un pore, une certaine proportion de leur contenu, puis se referment (Storrie and Desjardins, 1996)(Figure 4A). L'autre théorie décrit un « organite hybride » correspondant à la fusion totale entre un endosome tardif et un lysosome. Le lysosome se reformerait alors ensuite (Luzio et al., 2000)(Figure 4B). Récemment, il a été montré par vidéomicroscopie couplée à la microscopie électronique (CLEM pour Correlative Live cell and Electron Microscopy) qu'en fait les deux mécanismes ont lieu de façon concomitante dans une même cellule (Bright et al., 2005).



**Figure 4. Mécanismes de fusion entre les endosomes tardifs et les lysosomes.**

**A.** Le mécanisme de fusion 'kiss-and-run', au cours duquel l'endosome et le lysosome ne fusionnent que partiellement, échangent leur matériel et se séparent. **B.** Mécanisme de fusion directe, au cours duquel l'endosome et le lysosome fusionnent totalement, formant un « organite hybride ». Le lysosome se reforme après la dégradation du matériel apporté par l'endosome tardif.

## **2. La dynamique de la voie endocytaire**

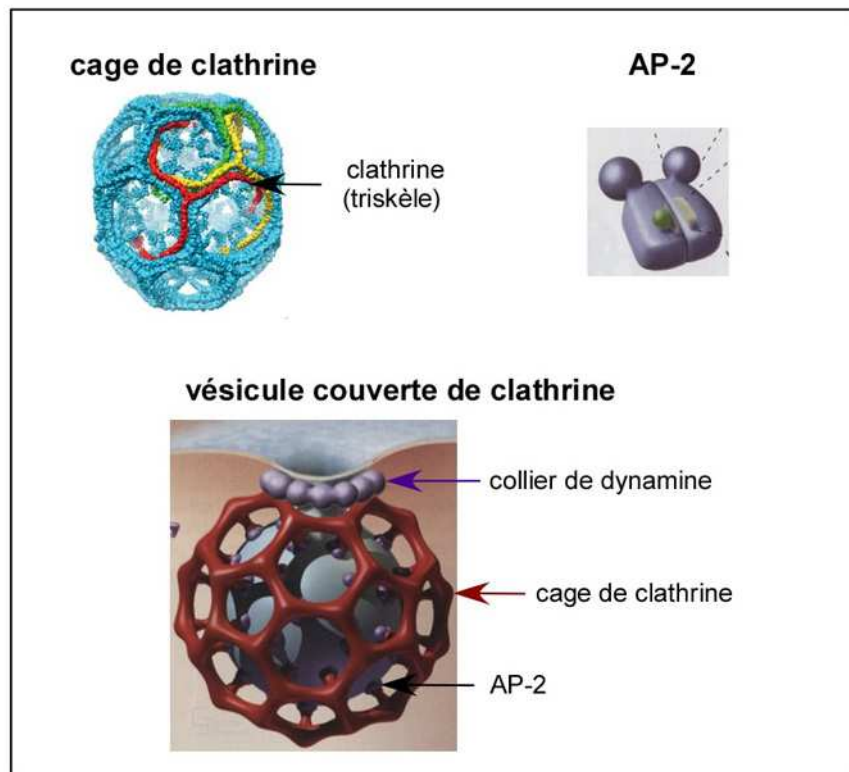
La dynamique des compartiments de la voie endocytaire fait l'objet de controverses notamment pour le passage de l'endosome précoce vers l'endosome tardif : la théorie des « compartiments stables » propose que les endosomes précoces et tardifs sont des compartiments pré-existants et stables, alimentés via un trafic de vésicules qui leur apportent les cargos, à l'image des compartiments de la biosynthèse (Griffiths and Gruenberg, 1991). L'autre théorie, dite de « maturation des compartiments », semble la plus admise aujourd'hui ; elle postule que les endosomes précoces sont formés *de novo* par la fusion des vésicules qui arrivent de la membrane plasmique. Leur composition change, certaines molécules étant recyclées et d'autres arrivant du TGN, et ils deviennent ainsi peu à peu des endosomes tardifs, puis finalement des lysosomes (Murphy, 1991; Rink et al., 2005). Un modèle récent décrit un endosome intermédiaire entre les endosomes précoces et endosomes tardifs. Celui-ci a été nommé « coated endosome » ou « endosome mantelé », du fait de la présence d'une bicouche plate de clathrine qui couvre certaines zones de ces endosomes (Bonifacino and Rojas, 2006). Bien que le rôle de cette bicouche de clathrine ne soit pas encore élucidé, elle semble jouer un rôle dans la séquestration des récepteurs ubiquitinylés qui vont être concentrés dans les vésicules intraluminales des MVB (Raiborg et al., 2003). L'endosome mantelé comprend également un vaste réseau tubulaire, dans lequel chaque tubule serait dédié à une fonction de recyclage ou de tri spécifique. Par exemple, un ou plusieurs tubules permettraient le transport rétrograde vers le TGN de toutes les protéines impliquées dans les mécanismes de recrutement, de bourgeonnement, d'ancrage et de fusion de membranes et d'autres seraient dédiés au recyclage des récepteurs à la membrane plasmique (Bonifacino and Rojas, 2006).

## **3. Les différentes voies d'entrées**

### **3. 1. L'endocytose à récepteurs dépendante de la clathrine**

De nombreux récepteurs sont internalisés par la voie d'endocytose dépendante de la clathrine : les plus classiquement cités sont les récepteurs aux LDL et à la transferrine, qui sont recyclés à la membrane, et le récepteur à l'EGF qui est dégradé suite à son internalisation (Goldstein et al., 1985). Les récepteurs membranaires qui doivent être internalisés sont spécifiquement concentrés dans des puits à clathrine. La clathrine est un complexe protéique hexamérique en forme de triskèle, qui a la propriété de s'autoassembler pour former une sorte

de cage sphérique creuse, dans laquelle la membrane plasmique est guidée sous l'influence d'un stimulus d'assemblage (Figure 5).



**Figure 5. Clathrine et le complexe AP-2 dans les vésicules couvertes de clathrine.**

L'association des molécules de clathrine forme une cage (en bleu), grâce à la forme de triskèle (en rouge, jaune, vert) de la molécule de clathrine. Le complexe AP-2 s'associe à la clathrine et au domaine cytoplasmique des récepteurs membranaires à internaliser. Ceux-ci se retrouvent enfermés à l'intérieur de la vésicule, elle-même enfermée dans la cage de clathrine. Un collier de dynamine permet la séparation de la vésicule de la membrane plasmique (d'après (Fotin et al., 2004) et (Pollard and Earnshaw, 2004)).

La formation d'une vésicule couverte de clathrine fait intervenir de nombreuses protéines, et notamment le complexe AP-2 (pour « Adaptator/Assembly Protein-2 »), spécifique du trafic vésiculaire à la membrane plasmique. Cet adaptateur possède plusieurs domaines, l'un liant la clathrine, l'autre s'associant à la partie cytosolique des récepteurs à internaliser (Brodsky et al., 2001). Une fois la vésicule formée, elle se détache de la membrane plasmique et se retrouve dans le cytosol où elle perd son manteau de clathrine. Elle rejoint ensuite la voie endocytaire en fusionnant avec les endosomes précoces.

### 3. 2. L'endocytose via les radeaux lipidiques et les cavéoles

Il existe une voie d'endocytose connue depuis longtemps, dans laquelle les vésicules d'internalisation sont appelées cavéoles. Les cavéoles sont de petite taille (50 à 150 nm de profondeur) et sont décrites comme ayant une forme d'oméga inversé. Elles sont

particulièrement abondantes dans les cellules endothéliales où elles opèrent la transcytose de molécules du sang vers l'espace interstitiel. On sait aujourd'hui que les cavéoles sont des radeaux lipidiques contenant la cavéoline-1, une petite protéine membranaire intégrale ayant une forte affinité pour le cholestérol, qui est à l'origine de la forme particulière des ces vésicules. Les radeaux lipidiques (ou « lipid raft ») sont des microdomaines lipidiques riches en cholestérol et en sphingolipides. Ils ont été isolés grâce à leur propriété d'insolubilité dans les détergents non ioniques à froid, mais ont également été observés avec des techniques de microscopie. Les protéines habituellement enrichies dans les radeaux lipidiques sont les protéines à ancre GPI (pour Glycosyl Phosphatidylinositol), des protéines acylées, des récepteurs couplés à la protéine G, les tyrosine kinases, ainsi que les lipides servant de messagers secondaires. Ces radeaux sont des plateformes membranaires dédiées à la signalisation cellulaire (Simons and Toomre, 2000). Les cavéoles auraient une double fonction de plateformes de transduction du signal et d'endocytose, et elles pourraient contrôler des cascades de signalisation en ciblant des molécules du signal vers des compartiments intracellulaires précis (Shaul and Anderson, 1998).

De plus en plus de données indiquent qu'il existe une voie d'endocytose médiée par les radeaux lipidiques. C'est par cette voie que le récepteur  $\beta$  de l'interleukine-2 (Lamaze et al., 2001) ou certains antigènes comme le virus non-enveloppé SV40 (Damm et al., 2005) sont internalisés. Elle est subdivisée en voies dépendante et indépendante de la dynamine. Ainsi, la voie via les cavéoles serait une forme spécialisée de la voie dépendante de la dynamine, avec une morphologie particulière des radeaux lipidiques due à la présence de la cavéoline-1. La machinerie moléculaire de ces voies, qui représenteraient la forme la plus primitive de l'endocytose, est encore très peu caractérisée (Kirkham and Parton, 2005).

### **3. 3. La pinocytose**

La pinocytose, appelée également endocytose de phase fluide, permet l'entrée de fluide dans la cellule. La micropinocytose permet l'internalisation de petits volumes de milieu extracellulaire dans des petites vésicules ; elle pourrait en fait correspondre à la voie d'endocytose médiée par les radeaux lipidiques décrite ci-dessus. La macropinocytose permet la séquestration de grands volumes dans des vésicules de taille bien plus importante (0,5-5  $\mu\text{m}$ ) (Lamaze and Schmid, 1995; Norbury, 2006). La formation des macropinosomes dépend d'un processus dynamique sous-tendu par le cytosquelette d'actine. La macropinocytose est constitutive dans certaines cellules, comme certaines souches d'amibes, ou chez les cellules dendritiques, qui prélèvent des grands volumes de milieu extérieur pour assurer la

surveillance immunitaire. Dans les autres cellules de mammifères, elle est stimulée par des facteurs de croissance ou des esters de phorbol. Certains virus et bactéries, comme la *Salmonelle*, déclenchent ce processus pour envahir la cellule (Norbury, 2006).

### **3. 4. La phagocytose**

La phagocytose est un mécanisme d'internalisation de grosses particules étrangères, comme des bactéries. Chez les êtres unicellulaires comme l'amibe, elle est utilisée comme voie d'internalisation des nutriments. Chez les mammifères, elle joue surtout un rôle central dans l'immunité innée et adaptative. Les phagocytes professionnels sont les macrophages, les neutrophiles et les cellules dendritiques (Desjardins et al., 2005).

La phagocytose comprend trois étapes : l'adhésion, l'ingestion et la digestion. L'adhésion se fait entre un ligand de la particule et un ou plusieurs types de récepteurs du phagocyte, qui, en déclenchant une cascade de signalisation complexe, entraîne une réorganisation du cytosquelette et une extension de pseudopodes pour englober la particule et former une vacuole appelée phagosome (étape d'ingestion). Jusqu'à récemment, il était admis que le phagosome était formé par une invagination de la membrane plasmique, éventuellement complété par une exocytose d'endosomes de recyclage et/ou de lysosomes. Une étude protéomique globale de phagosomes purifiés (Garin et al., 2001) a récemment montré que la source principale de membrane pour la phagocytose est le réticulum endoplasmique (RE) (Gagnon et al., 2002). Ce travail donne lieu à des controverses (Touret et al., 2005), car il remet en cause le dogme initial. Le phagosome devient ensuite un phagolysosome par un processus de maturation où il est séquentiellement mis en contact avec des endosomes précoces, des endosomes tardifs puis des lysosomes, selon un mécanisme de fusion 'kiss and run' (cf Figure 4A)(Desjardins, 1995).

## **II. LES LYSOSOMES**

La taille des lysosomes est généralement inférieure à 1  $\mu\text{m}$ , mais elle peut atteindre plusieurs micromètres, par exemple dans les macrophages. Leur position intracellulaire est souvent spécifique du type cellulaire ; par exemple dans le cytoplasme périnucléaire dans les fibroblastes en culture ou proche des canalicules biliaires dans les hépatocytes. Dans un organe donné, certains types cellulaires vont être très riches en lysosomes, alors que d'autres vont en avoir très peu, en concordance avec leur fonction. Par exemple, dans le rein, les tubules proximaux sont riches en lysosomes car ils endocytent et dégradent les protéines qui

ont été filtrées à travers le glomérule, alors que les cellules épithéliales des néphrons, qui se trouvent en aval des tubules, en contiennent très peu (Christensen and Birn, 2002).

## **1. Historique**

Les lysosomes ont été découverts en 1955 par Christian de Duve et ses collaborateurs, qui ont observé que la phosphatase acide était enfermée dans des « granules cytoplasmiques » dont les propriétés de sédimentation étaient distinctes de celles des mitochondries et des microsomes (Appelmans et al., 1955). Ils ont également observé que très peu d'activité enzymatique était détectable sur des préparations fraîches de ces granules, dont l'intégrité membranaire avait été préservée, alors que des traitements provoquant des chocs osmotiques entraînaient une libération de l'activité dans la fraction soluble. Puis d'autres activités enzymatiques solubles à pH optimum acide (pH = 4,0-4,5) ont été isolées de cette fraction L : la  $\beta$ -glucuronidase, la cathepsine D, la ribonuclease et la déoxyribonuclease. Le nom « lysosome » (« corps digestif » en grec) a ainsi été choisi pour cet organe renfermant des enzymes dont les substrats sont très différents (de Duve, 2005). Cette caractérisation biochimique a été poursuivie par des analyses morphologiques, qui ont révélé en microscopie électronique les lysosomes comme étant des corps denses aux électrons.

## **2. Composants du lysosome**

### **2. 1. Le contenu soluble du lysosome : les hydrolases acides**

Le lysosome renferme plus de 50 hydrolases solubles, qui sont actives de manière optimale à pH acide. L'ensemble de ces hydrolases est capable de dégrader toute sorte de substrats soit pour les réduire en molécules simples soit pour les transformer en un métabolite spécifique. Presque chacune de ces enzymes est associée à une pathologie dans le cas où son activité est déficiente. Ces pathologies sont appelées « maladies de surcharge » (cf paragraphe 5. ).

Les protéases lysosomales comprennent les cathepsines, qui sont pour la plupart des endopeptidases. Certaines sont exprimées de manière ubiquitaire (par exemple les cathepsines C, D et O)(Barrett, 1970; Pham et al., 1997; Velasco et al., 1994), d'autres sont plus spécifiques de certains tissus, comme la cathepsine K dans les ostéoclastes (Saftig et al., 1998), dans les cellules épithéliales des poumons (Buhling et al., 1999) et de la thyroïde (Tepel et al., 2000). Ces enzymes ont un rôle important dans le catabolisme lysosomal des protéines, mais elles interviennent également en dehors du lysosome, dans le cadre de l'homéostasie des tissus. Elles sont parfois sécrétées pour dégrader la matrice extracellulaire.



Par exemple, lors d'une ablation de la prostate ou du sein, l'expression de la cathepsine B est beaucoup plus élevée dans les glandes en cours de régression que dans celles à l'état normal (Guenette et al., 1994). Les cathepsines B, K, L, D interviennent aussi dans la maturation de la thyroglobuline en thyroxine dans la matrice extracellulaire de la thyroïde (Friedrichs et al., 2003). Ces enzymes sont régulées par des inhibiteurs, comme les cystatines ou les stefines, mais leur activation est également un processus contrôlé. Par exemple, la pro-cathepsine D humaine de 53 kDa ne devient active que lorsque son pro-peptide est clivé, démasquant alors le site actif. Puis cette chaîne de 47 kDa est clivée en deux chaînes de 14 et 31 kDa (Gieselmann et al., 1983). Le processus exact de sa maturation n'est pas encore totalement élucidé, même si vraisemblablement elle combine une autocatalyse à pH acide et l'intervention d'autres protéases (Gieselmann et al., 1985; Turk et al., 2000).

Pour dégrader les sucres des glycoprotéines, des glycolipides, ainsi que le glycogène et les glycosaminoglycanes, les lysosomes renferment de nombreuses exoglycosidases ( $\alpha$ - et  $\beta$ -mannosidases,  $\alpha$ - et  $\beta$ -galactosidases,  $\beta$ -hexosaminidases,  $\alpha$ -sialidase,  $\alpha$ -glucosidase,  $\alpha$ -fucosidase, etc.). Les glycosaminoglycanes, aussi appelés mucopolysaccharides, sont des composants importants des tissus conjonctifs (le mésenchyme, les cartilages, les os, etc.). Pour dégrader ces polymères de sucres sulfatés, il existe plusieurs hydrolases spécifiques comme l'iduronate sulfatase, l' $\alpha$ -iduronidase, l'héparane N-sulfatase, la galactose 6-sulfatase, la hyaluronidase, etc. (Winchester, 2005).

La vaste gamme de lipides cellulaires est également dégradée dans les lysosomes : la sphingomyéline par les sphingomyélinase et céramidase acides, les triglycérides par la lipase acide, les gangliosides (des lipides complexes du cerveau) par la glucocérébrosidase, les sulfatides (constituants des gaines de myéline des cellules nerveuses et des cellules épithéliales rénales) par l'arylsulfatase A et la  $\beta$ -galactosylcéramidase. Les acides gras et les groupements prényls des protéines porteuses de ce type de modification post-traductionnelles sont hydrolysés par la palmitoyl-protein thioestérase 1 et la prényl-cystéine lyase (Lu and Hofmann, 2006).

Parmi les autres hydrolases, on trouve des phosphatases, des nucléases comme la déoxyribonucléase (DNase) II, capable de dégrader l'ADN des corps apoptotiques (Evans and Aguilera, 2003).

## **2. 2. Les protéines membranaires lysosomales**

La membrane du lysosome a un rôle important de séquestration des enzymes lysosomales à l'écart du reste du cytoplasme. Sans cette membrane, ces enzymes pourraient avoir un rôle

dévastateur pour l'intégrité de la cellule. Cette membrane assure aussi la fusion entre les lysosomes et d'autres organites (les endosomes tardifs, le phagosome, par exemple) ou le transport vers le cytoplasme des métabolites obtenus après dégradation, grâce à des transporteurs membranaires.

Les protéines membranaires les plus abondantes sont les LAMPs (pour Lysosomal Associated Membrane Protein) et les LIMPs (pour Lysosomal Integral Membrane Protein), qui représentent environ 50 % des protéines de la membrane des lysosomes et des endosomes tardifs. Leur queue cytosolique est très courte (une dizaine d'acides aminés), à l'inverse de leur domaine luminal. Celui-ci porte de nombreuses glycosylations de type poly-N-acetylactosamines qui forment une barrière dense sur la face intérieure du lysosome appelée « glycocalix ». Il a été proposé que ces glycosylations protègent la membrane du lysosome contre les hydrolases qu'elle renferme (Fukuda, 1991). Cependant, une étude récente a montré que ces glycosylations servent en fait à protéger les protéines LAMP-1 et LAMP-2 de la dégradation par les protéases. Non glycosylées, ces protéines sont dégradées dans la membrane du lysosome, alors que les lysosomes conservent leur propriétés (pH, osmolarité, densité) et leur fonction dégradative (Kundra and Kornfeld, 1999). La fonction des protéines LAMP a été étudiée grâce à des souris « knocked-out » (K.O) pour ces gènes. Les souris déficientes en LAMP-1 sont viables et fertiles, les tissus sont normaux ou peu affectés, et les lysosomes sont identiques aux lysosomes contrôles. Il a été remarqué que la protéine LAMP-2 était plus abondamment exprimée dans ces souris, probablement pour compenser la déficience en LAMP-1 (Andrejewski et al., 1999). Les souris K.O. pour LAMP-2 présentent en revanche un phénotype avec des symptômes graves : la moitié des souris meurent un mois après la naissance ; elles sont beaucoup plus petites que les souris contrôles. L'observation en microscopie électronique révèle une accumulation de vacuoles d'autophagie dans des organes comme le foie, le cœur et les muscles (Tanaka et al., 2000). Chez l'homme, la maladie qui correspond à une déficience en LAMP-2 est appelée maladie de Danon. L'inactivation des deux gènes codant pour LAMP-1 et LAMP-2 est létale, les souris meurent à l'état embryonnaire (Eskelinen et al., 2004). Récemment, il a été montré que ces deux protéines LAMP-1 et LAMP-2 permettaient la fusion des lysosomes avec le phagosome, suggérant un rôle de ces deux protéines dans le déplacement des organites vers le centrosome (Huynh et al., 2007).

Les autres protéines membranaires « structurales » des lysosomes sont les protéines CD63/LIMP-1/LAMP-3 et LIMP-2/LGP85. Elles participent aux mécanismes de fusion entre organites, CD 63 dans l'activation des éosinophiles et la fusion des MVB avec la membrane

plasmique (Mahmudi-Azer et al., 2002) et LIMP-2 dans la régulation de la morphologie des endosomes et des lysosomes (Kuronita et al., 2002).

Le pH lysosomal, paramètre essentiel dans le bon fonctionnement du compartiment, est maintenu par l'ATPase vacuolaire (V-ATPase). Cet enzyme est composé de 13 sous-unités, dont 8 servent à hydrolyser l'ATP du côté cytosolique et les 5 autres, intégrés dans la membrane, transportent les protons (Forgac, 1999).

Dans la membrane résident également des transporteurs pour transloquer hors du lysosome les métabolites après hydrolyse (acides aminés, acides gras, oses, vitamine B12 et cholestérol, etc). Des expériences biochimiques et cinétiques de flux de métabolites radiomarqués hors des lysosomes ont démontré l'existence d'au moins 20 transporteurs (Pisoni and Thoene, 1991). Cependant, à ce jour, seuls quelques gènes de transporteurs sont identifiés et les protéines correspondantes caractérisées au niveau moléculaire et fonctionnel, comme la cystinosine, la sialine et des canaux à chlore.

La cystinosine est un transporteur lysosomal de la cystine (molécule formée de deux cystéines liées par un pont disulfure) hors du lysosome (Gahl et al., 1982). Ce transporteur a été caractérisé par un modèle *in vitro* qui consiste à introduire une mutation sur le motif de ciblage de ce transporteur pour qu'il soit ciblé vers la membrane plasmique au lieu du lysosome. L'orientation du transporteur à la membrane plasmique est alors telle que le milieu extracellulaire est équivalent au lumen lysosomal. Cette technique constitue un test fonctionnel pour mesurer les efflux lysosomaux, en se plaçant dans un milieu extérieur acide. Il a été montré ainsi que la cystinosine est un symporteur, qui couple la translocation de la cystine à celle des H<sup>+</sup> (Kalatzis et al., 2001). La déficience en ce transporteur provoque une maladie appelée «cystinose », dont les symptômes sont une insuffisance rénale, des problèmes oculaires et des dysfonctionnements des glandes endocrines. Il existe principalement trois formes cliniques, plus ou moins sévères, dues à des mutations ponctuelles sur le gène CTNS codant pour la cystinosine. Grâce au test fonctionnel *in vitro*, l'activité du transport a été mesurée pour 31 mutations ponctuelles affectant la cystinosine ; il a été montré que la forme infantile sévère concorde généralement avec une absence totale de transport de cystine (Kalatzis et al., 2004).

La sialine est un transporteur d'anions, qui a d'abord été identifié comme un transporteur des acides monosaccharidiques comme l'acide sialique et l'acide glucuronique (Havelaar et al., 1999). La déficience en sialine provoque une accumulation d'acide sialique dans les lysosomes, dont il existe une forme infantile sévère, la ISSD (pour Infantile Sialic acid Storage Disease) et une forme qui touche le système nerveux central mais ne provoque pas la

mort à un âge précoce, appelée la maladie de Salla. Avec un test fonctionnel similaire à celui employé pour caractériser la cystinosine, il a été montré que les mutations qui provoquent la ISSD codent pour une forme de sialine où le transport est totalement aboli, alors que la mutation qui provoque la maladie de Salla code pour une forme de sialine où le transport est ralenti (Morin et al., 2004).

Les autres transporteurs lysosomaux connus sont des canaux à chlore qui assurent l'électroneutralité des flux de  $H^+$  de la V-ATPase par le transport des ions  $Cl^-$ . Il s'agit notamment du complexe ClC-7-Ostm-1 dans la bordure membranaire en brosse des ostéoclastes (Kornak et al., 2001; Lange et al., 2006) et de ClC-6 (Poet et al., 2006). Dans les neurones, les lysosomes ont également une P-ATPase, nommée ATP13A2 (Ramirez et al., 2006). LYAAT-1 est un transporteur de petits acides aminés neutres (Sagne et al., 2001), et NRAMP2 est un transporteur de fer (Tabuchi et al., 2000).

D'autres transporteurs lysosomaux sont en cours de caractérisation, comme par exemple la protéine p40, qui a une homologie de séquence avec un transporteur de sucres nucléotidiques (Boonen et al., 2006). D'autres transporteurs sont associés à des maladies neurodégénératives, comme par exemple une forme de la céréoïde-lipofuscinose neuronale ou la maladie de Niemann-Pick type C, dues à des mutations dans les gènes codant pour respectivement, la protéine CLN3 et la protéine NPC1. Les fonctions exactes de ces protéines sont difficiles à cerner. CLN3, par homologie avec la protéine de levure Btn1 serait, entre autres fonctions, impliquée dans le transport d'arginine, mais vers l'intérieur du lysosome (Kim et al., 2003). D'autres fonctions sont conférées à la CLN3, comme une fonction de contrôle du pH lysosomal (Golabek et al., 2000) ou de régulation du trafic des compartiments tardifs dans la voie endocytaire (Luiro et al., 2004). La déficience en NPC1 provoque une accumulation du cholestérol lysosomal, mais son implication directe dans le transport hors des lysosomes est controversée (Davies et al., 2000). Le transport du cholestérol lysosomal implique également une autre protéine lysosomale, NPC2. Cette protéine soluble lie une grande variété de stérols (Cheruku et al., 2006; Liou et al., 2006).

### **3. Ciblage des protéines lysosomales**

#### **3. 1. Ciblage des protéines M6P**

##### **3. 1. 1. Le mécanisme de ciblage**

Pour leur transport jusqu'aux lysosomes, les précurseurs d'hydrolases lysosomales acquièrent une modification post-traductionnelle spécifique dans l'appareil de Golgi, qui est un sucre mannose-6-phosphate (M6P) spécifiquement reconnu par les MPR. Cette modification est portée par les résidus mannose des N-glycosylations. Elle est réalisée par l'action concertée de deux enzymes. La première enzyme est une UDP-GlcNac phosphotransférase (GlcNac pour N-acetyl Glucosamine) qui transfère du GlcNac 1-phosphate provenant d'un sucre nucléotidique UDP-GlcNac sur un résidu mannose. Cette enzyme reconnaît un domaine protéique spécifique des précurseurs d'hydrolases lysosomales, mais celui-ci n'est pas encore bien caractérisé. Il semble au moins impliquer deux résidus lysine dans une boucle  $\beta$ , orientés d'une manière précise par rapport au sucre (Steet et al., 2005). La deuxième enzyme est une phosphodiesterase qui enlève le sucre GlcNac. Lorsqu'une N-glycosylation comporte du M6P, elle ne peut plus être maturée en sucre complexe. Dans la mucopolidose de type II (ML II), appelée également « Inclusion Cell Disease » (ICD), l'activité de l'UDP-GlcNac phosphotransférase est déficiente, suite à une mutation sur le gène codant pour cette enzyme (Tiede et al., 2005). Les hydrolases sont synthétisées normalement mais elles ne peuvent pas être délivrées aux lysosomes par les MPR, du fait qu'elles ne portent pas de sucres M6P. Elles sont pour la plupart sécrétées dans le milieu extracellulaire. Les fibroblastes des malades présentent des lysosomes géants (formant des « inclusions ») car l'absence des hydrolases entraîne une accumulation de substrats non dégradés (Hasilik et al., 1981). Cependant, dans certains organes et types cellulaires, les activités des hydrolases lysosomales sont comparables à celles de personnes saines (Glickman and Kornfeld, 1993; Owada and Neufeld, 1982).

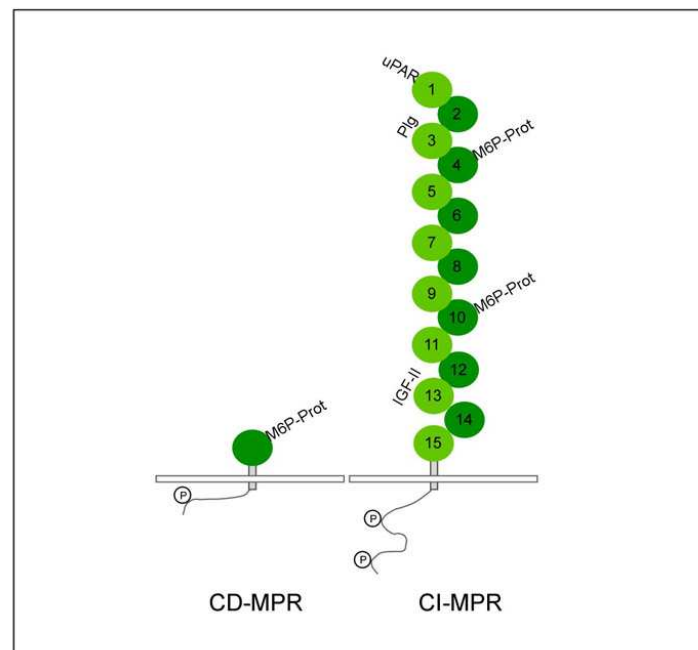
Dans l'appareil de Golgi, les MPR lient les protéines M6P néosynthétisées. Ils sont ensuite concentrés dans des vésicules qui bourgeonnent hors du TGN et qui rejoignent la voie endocytaire en fusionnant majoritairement avec les endosomes précoces (Press et al., 1998; Waguri et al., 2003). Le pH acide du compartiment provoque la dissociation entre les MPR et leur cargo. Les précurseurs de protéines lysosomales se retrouvent alors libres dans la lumière de l'endosome alors que les MPR sont extraits pour être recyclés vers le TGN grâce à un complexe appelé « rétromère » dont le mécanisme d'action n'est pas encore élucidé

(Bonifacino and Rojas, 2006). A ce stade, les précurseurs d'hydrolases lysosomales subissent fréquemment une maturation protéolytique qui les rend actives (Gieselmann et al., 1983). Une fois arrivées dans les lysosomes, une phosphatase enlève le phosphate des sucres M6P (Einstein and Gabel, 1991).

### 3. 1. 2. Les récepteurs au M6P

Deux récepteurs assurent le ciblage des protéines M6P néosynthétisées : le récepteur au mannose-6-phosphate dépendant des cations divalents (CD-MPR, pour cation-dependent M6P Receptor) et le récepteur au mannose-6-phosphate indépendant des cation divalents (CI-MPR, pour cation-independent M6P Receptor) (Figure 6).

Ces deux récepteurs sont complémentaires : ils ciblent deux sous-ensembles de protéines M6P distincts mais qui se recouvrent (Ludwig et al., 1994). Les deux récepteurs ont la même affinité pour les protéines ayant un seul sucre M6P dans une N-glycosylation. En revanche, le CI-MPR lie plus fortement les protéines ayant deux sucres M6P dans une chaîne oligosaccharidique, ce qui est fréquent pour des protéines lysosomales (Cantor et al., 1992).



**Figure 6. Structure des récepteurs au mannose-6-phosphate (MPR).**

Le domaine extracytoplasmique/luminal du MPR indépendant des cations (CI-MPR) est composé de 15 unités répétées, qui lient chacune un ligand : M6P-Prot : protéines mannose-6-phosphate, uPAR : urokinase Plasminogen Activator Receptor, Plg : plasminogen, IGF-II : Insulin-like Growth Factor. Le domaine extracytoplasmique/luminal du MPR dépendant des cations (CD-MPR) n'a qu'un domaine, qui lie les protéines M6P. Ces récepteurs ont un seul domaine transmembranaire. Leur queue cytosolique comporte des motifs de tri et des sites de phosphorylation (notés « P »). Schéma réalisé d'après (Ghosh et al., 2003).

Le CI-MPR est un gros récepteur de 300 kDa environ, dont le domaine extracytoplasmique comporte 15 unités répétées qui fixent chacune un ligand différent. Son rôle intracellulaire est de cibler des protéines M6P aux lysosomes, mais c'est également un récepteur membranaire, capable de lier des protéines non lysosomales qui portent des sucres M6P (le précurseur du TGF- $\beta$ 1, la proliférine, le granzyme B, la thyroglobuline) et d'autres classes de ligands, comme le facteur de croissance IGF-II (Insulin-like Growth Factor II), une hormone mitogénique, l'uPAR (pour urokinase Plasminogen Activator Receptor), le plasminogène, l'acide rétinoïque (Ghosh et al., 2003).

Le CD-MPR est un petit récepteur de 46 kDa, dont le domaine extracytoplasmique est homologue aux 15 unités répétées du domaine extracytoplasmique du CI-MPR. Il ne transporte que les protéines M6P néosynthétisées vers les lysosomes. Même s'il est présent à la membrane plasmique et endocyté, il ne lie pas les protéines M6P extracellulaires (Stein et al., 1987).

Ces récepteurs sont principalement présents dans le TGN et dans la voie endocytaire ; une petite proportion est présente à la membrane plasmique (Geuze et al., 1988). La découverte du système de transport des enzymes lysosomales a d'ailleurs été initiée grâce à l'endocytose par les CI-MPR des protéines M6P qui suivent par erreur la voie de sécrétion. Elisabeth Neufeld a observé un phénomène de correction croisée (« cross-correction ») : la co-culture de fibroblastes de patients ayant deux maladies lysosomales différentes permet une correction mutuelle des déficiences (Neufeld et al., 1977). En effet, la petite proportion d'enzymes lysosomales sécrétée par un type de fibroblastes contient l'enzyme que les autres n'ont pas ; celle-ci est ainsi recaptée par les CI-MPR de la membrane plasmique par endocytose et transportée jusqu'aux lysosomes.

### **3. 2. Ciblage indépendant des récepteurs au M6P**

L'étude des patients atteints de ICD a révélé l'existence d'un routage lysosomal alternatif, indépendant des MPR. Malgré l'absence d'étiquette M6P sur les hydrolases néosynthétisées dans le cas des malades atteints de ICD, certains types cellulaires et organes (lymphocytes B, foie, rate, cerveau) ont des taux d'hydrolases lysosomales intracellulaires normaux (Glickman and Kornfeld, 1993; Glickman et al., 1996). Par ailleurs, il a été montré que la cathepsine D était à 50 % ciblée aux lysosomes indépendamment du M6P dans les cellules HepG2 (Rijnboutt et al., 1991a). Il en est de même pour la prosaposine et la glucocérébrosidase, qui ne portent pas de sucres M6P (Rijnboutt et al., 1991b). Il a été montré que ces protéines sont transportées aux lysosomes grâce à un routage impliquant des microdomaines de

sphingomyéline (des radeaux lipidiques)(Lefrancois et al., 2002) et la sortiline (Lefrancois et al., 2003).

### **3. 3. Ciblage des protéines lysosomales membranaires**

Les protéines membranaires résidentes des lysosomes peuvent être délivrées à ces compartiments par deux voies : une voie directe du TGN aux lysosomes et une voie indirecte où les protéines transitent par la membrane plasmique. Dans le cas des protéines LAMPs, après bien des controverses, il a été démontré récemment que les deux voies sont empruntées de manière égale (Janvier and Bonifacino, 2005). Dans le cas de la voie directe, les vésicules bourgeonnant du TGN contenant les protéines LAMP-1, LAMP-2/LPG85 et CD63 sont très probablement des vésicules couvertes de clathrine (Borner et al., 2006). Elles sont prises en charge par la protéine adaptatrice AP-3 (Le Borgne et al., 1998; Rous et al., 2002) pour être ciblées au niveau des endosomes tardifs et atteindre ensuite les lysosomes.

Le ciblage vers les lysosomes des protéines transmembranaires lysosomales dépend principalement de deux types de motifs situés sur la queue cytoplasmique de ces protéines : le signal « tyrosine » et le signal « di-leucine » (Bonifacino and Traub, 2003). Le signal « tyrosine » consiste en un motif consensus YXX $\Phi$ , avec la tyrosine comme résidu essentiel pour le processus de tri, X étant des résidus variables, mais généralement hydrophiles, et  $\Phi$  étant un résidu hydrophobe. Ce motif consensus est présent sur les protéines LAMP-1, LAMP-2 et CD63. Il est également utilisé pour l'internalisation des protéines de la membrane plasmique vers les endosomes (récepteur à la transferrine), vers des compartiments tardifs spécialisés (récepteur HLA-DM) ou vers le TGN (protéine TGN38). Le ciblage vers les lysosomes est favorisé par un résidu glycine juste avant le résidu tyrosine, des résidus acides comme résidus variables du motif consensus, et par une distance de 6 à 9 résidus entre ce motif et le passage transmembranaire.

Le signal « di-leucine » consiste en une séquence consensus [D/E]XXXL[L/I] dans laquelle deux résidus leucine (ou parfois un résidu leucine suivi d'une isoleucine) sont précédés d'un résidu acide situé 4 résidus avant la première leucine. Parfois, une sérine précède le résidu acide, et elle peut-être phosphorylée. Les protéines transmembranaires comportant ce motif activé sont localisées dans les endosomes tardifs, les lysosomes (par exemple NPC1 et LAMP-II) ou les compartiments endo-lysosomaux spécialisés (par exemple la chaîne invariante Ii dans les compartiments d'apprêtement des antigènes). Ce motif n'est pas exclusif des protéines résidentes de ces compartiments. Il est en effet également employé comme signal d'internalisation et de dégradation (par exemple, le récepteur de l'antigène des cellules-T) ou



dans les cellules polarisées comme signal de ciblage vers la membrane basolatérale (Bonifacino and Traub, 2003).

## **4. Fonctions des lysosomes**

### **4. 1. Le catabolisme général**

#### **4. 1. 1. Processus de dégradation**

La dégradation constitutive de macromolécules complexes provenant de l'extérieur (cf paragraphe endocytose) ou de l'intérieur (autophagie, cf paragraphe suivant) de la cellule se fait grâce à plus de 50 hydrolases actives au pH acide des lysosomes. Les vésicules intraluminales formées le long de la voie endocyttaire qui arrivent aux lysosomes sont des sortes de plateformes optimisées pour l'hydrolyse des membranes et des protéines membranaires qui les constituent. Elles ont été progressivement déplétées en cholestérol (Mobius et al., 2003) et enrichies en lipides anioniques et en un phospholipide particulier, le LBPA (pour Lyso-Bis Phosphatidic Acid), appelé également BMP (pour Bis Monoacylglycerol Phosphate). Il a été montré que des liposomes chargés négativement par la présence de phospholipides anioniques (comme le LBPA ou le phosphatidylinositol) stimulaient la dégradation lysosomale des substrats (glucosylceramide ou glycosphingolipide sulfaté) insérés dans ces même vésicules (Hepbildikler et al., 2002; Wilkening et al., 1998). Le LBPA représente 15% des phospholipides totaux des vésicules intraluminales. Sa configuration particulière en sn1, sn1' le rend très résistant à la dégradation par les phospholipases (Amidon et al., 1995).

Les principes de la dégradation lysosomale des membranes ont été déduits de l'étude du catabolisme des sphingolipides, à travers des recherches sur les sphingolipidoses, notamment la gangliosidose-GM1 ou la déficience en saposines, également appelées SAPs (pour Shingolipid Activator Proteins) (Furst and Sandhoff, 1992). Les saposines A, B, C, D sont issues du clivage d'un même précurseur appelé « prosaposine ». Ce sont des petits cofacteurs protéiques qui s'insèrent dans la bicouche lipidique des vésicules intraluminales et qui extraient le glycolipide de la membrane pour le rendre accessibles aux hydrolases. Les phospholipides sont apparemment dégradés sans cofacteurs (Kolter and Sandhoff, 2005).

#### **4. 1. 2. Autophagie**

L'autophagie est une voie de dégradation lysosomale du matériel cytoplasmique, très conservée chez les eucaryotes. Des composés non essentiels sont dégradés pour libérer des

unités simples qui sont alors utilisées pour des réactions biosynthétiques vitales. Elle est induite lors d'un stress, comme une privation en nutriments ou une infection virale, mais intervient également dans des processus physiologiques comme le développement, la régulation de la croissance, la longévité et la mort cellulaire programmée. Plusieurs types d'autophagie existent : la micro-autophagie, l'autophagie médiée par les chaperones, la crinophagie et la macro-autophagie, souvent appelée simplement autophagie.

Dans la micro-autophagie, une petite portion de cytoplasme est séquestrée par la membrane du lysosome elle-même (Ahlberg et al., 1982). Dans l'autophagie médiée par les chaperones, des protéines cytosoliques comprenant la séquence KFERQ dans leur séquence primaire sont transportées du cytoplasme vers la lumière des lysosomes. Cette translocation à travers la membrane lysosomale est réalisée grâce à un complexe multi-moléculaire de protéines chaperones, formé de hsc73 et d'une isoforme de LAMP-2 (Cuervo and Dice, 1998). La crinophagie est spécifique des cellules spécialisées dans la sécrétion ; elle correspond à une fusion des granules de sécrétion avec les lysosomes (Glaumann et al., 1989).

La macroautophagie a été bien caractérisée au niveau moléculaire par l'étude de la génétique des levures ; dans ce modèle, 27 gènes liés à l'autophagie ont été identifiés et appelés atg (pour autophagy-related genes). Une dizaine de gènes homologues ont été identifiés chez les mammifères. Ainsi, un marqueur des vacuoles d'autophagie est la protéine LC3 (pour microtubule associated protein Light Chain 3, l'orthologue de la protéine de levure ATG8), qui joue un rôle dans les étapes initiales de formation des vacuoles et dont une partie reste piégée à l'intérieur de ces compartiments (Kabeya et al., 2000).

Après un signal d'induction, l'autophagie commence avec la formation d'une citerne membranaire qui entoure la portion de cytosol et/ou d'organite à dégrader, jusqu'à enfermer complètement ce matériel dans une vacuole appelée autophagosome. A ce stade, l'autophagosome est encore dépourvu d'enzymes lysosomales. La membrane de l'autophagosome est appelée phagophore ou membrane d'isolation. Son origine est inconnue, bien que certaines données indiqueraient qu'elle provienne du RE, sous l'effet d'un stress (Mijaljica et al., 2006). Puis l'autophagosome subit des étapes de maturation : il fusionne d'abord avec les endosomes et devient un amphisome, puis il fusionne avec les lysosomes et devient alors un autolysosome (Eskelinen, 2005).

Dans les études morphologiques, ces trois compartiments sont désignés comme des vacuoles autophagiques, et sont plutôt classifiés en vacuoles autophagique initiales (AVi) et en vacuoles autophagiques dégradatives (AVd), selon l'apparence ultrastructurale du matériel à l'intérieur des vacuoles. En microscopie électronique, on distingue clairement les AVd qui

contiennent du matériel dense et des structures désintégrées, alors que le cytosol ou les organites sont encore intacts dans les AVi.

## **4. 2. Autres fonctions des lysosomes**

### **4. 2. 1. Fonctions ubiquitaires**

Les lysosomes ont longtemps été décrits comme les compartiments terminaux de la voie endocytaire, un « estomac » hydrolysant les molécules en unités simples. Depuis environ 15 ans, il a été montré que de nombreux processus physiologiques autres font intervenir les lysosomes. Il s'agit par exemple de l'homéostasie du cholestérol, de la réparation de la membrane plasmique, du remodelage osseux, de la défense contre les pathogènes, de la mort cellulaire, de la signalisation cellulaire. Quelques-uns de ces mécanismes sont décrits dans les paragraphes suivants.

#### **4 . 2 . 1 . 1 Réparation de la membrane plasmique**

Les lysosomes sont capables de fusionner avec la membrane plasmique dans le cas où celle-ci est déchirée. L'augmentation de la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire suite à la rupture de la membrane peut provoquer la mort cellulaire en quelques secondes, et nécessite une réponse très rapide pour colmater la membrane lésée. Ces lésions sont fréquentes dans les cellules soumises à des stress mécaniques, comme les cellules des muscles squelettiques ou les cellules épithéliales des glandes mammaires. Deux théories s'affrontent pour expliquer le mécanisme de colmatage : l'une propose que le patch membranaire est formé par la fusion des membranes lysosomales avec la membrane plasmique. Le signal d'exocytose des lysosomes serait régulé par la synaptotagmine VII, une protéine lysosomale membranaire senseur de la concentration intracellulaire en  $\text{Ca}^{2+}$  (Andrews, 2005). L'autre théorie propose que le patch serait formé par les enlargeosomes, organites ubiquitaires peu décrits, caractérisés par la présence de la protéine desmoyokin/Ahnak, et dont le rôle serait précisément de colmater les lésions de la membrane plasmique (Borgonovo et al., 2002; Cerny et al., 2004).

#### **4 . 2 . 1 . 2 Implication dans la mort cellulaire**

Les hydrolases lysosomales sont impliquées de différentes manières dans les mécanismes de mort cellulaire. Dans le cas de la nécrose, les membranes lysosomales, désintégrées, libèrent les hydrolases qui vont dégrader des substrats de manière non spécifique. Il existe également une mort des cellules neuronales par autophagie, dans la maladie de Huntington (Kegel et al., 2000). L'apoptose est un autre mécanisme de mort cellulaire, physiologique, qui permet aux cellules de disparaître « proprement » lors de la morphogénèse, de la maturation du système immunitaire et l'élimination des lymphocytes autoréactifs (B ou T), ou encore pour le

renouvellement des cellules intestinales. Parfois l'entrée en apoptose des cellules n'est pas physiologique ; elle peut être due à un stress comme une irradiation, une infection virale, une chimiothérapie. Les deux grandes voies d'induction de l'apoptose, la voie intrinsèque et la voie extrinsèque, provoquent toutes les deux une cascade d'activation de protéines qui aboutissent à l'activation de caspases (cystéines-aspartate protéases) dans le cytoplasme, avec l'entrée en phase d'exécution lorsque la caspase-3 est activée.

Le lysosome, qui renferme un cocktail d'activités hydrolytiques, est potentiellement dangereux pour la cellule. Ainsi, il a été montré que la fuite du contenu soluble lysosomal dans le cytosol provoquait la mort par apoptose. Cette fuite peut être provoquée par des composés qui perméabilisent la membrane lysosomale, par exemple la sphingosine (Kagedal et al., 2001), les radicaux libres (Brunk et al., 1997), des composés lysosomotropiques (bases faibles qui se protonnent à pH acide, et ne peuvent plus diffuser hors du lysosome). Indépendamment, il a été mis en évidence que les cathepsines D, B et L jouaient un rôle dans les étapes précoces de l'apoptose. Leur rôle exact est difficile à établir car selon le type cellulaire étudié et la voie d'apoptose déclenchée elles provoquent la survie ou la mort. Par exemple, la transfection des cellules HeLa avec l'ARN antisens ciblant la cathepsine D permet aux cellules de survivre à la mort par apoptose induite par l'interféron- $\gamma$  et FAS, et la surexpression ectopique de la cathepsine D provoque la mort des cellules par apoptose sans stimulus externe (Deiss et al., 1996). Cependant, d'autres études montrent l'inverse. Ainsi, par exemple, des fibroblastes de mouton atteints de ceramide-lipofuscinose neuronale, qui expriment une cathepsine D stable mais inactive, meurent d'apoptose induite par la doxorubicine de la même manière que des fibroblastes normaux (Tardy et al., 2003). De même, il a été montré que la cathepsine B était responsable du déclenchement de la mort par apoptose d'hépatocytes traités avec du TFN- $\alpha$  (Guicciardi et al., 2000). Les souris K.O. pour le gène codant pour la cathepsine L présentent une hyperprolifération des kératinocytes, soit un défaut d'apoptose de ce type cellulaire (Roth et al., 2000). A l'inverse, les souris double K.O. pour les cathepsines B et L présentent des atrophies du cerveau, du fait de mort neuronale massive par apoptose (Felbor et al., 2002). Le mécanisme qui permet à ces hydrolases d'être transloquées ou exprimées dans le cytosol n'est pas encore totalement élucidé.

Dans le cas du cancer, qui est une maladie complexe où des cellules perdent le contrôle de leur prolifération et n'entrent plus en apoptose, une surexpression et une hypersécrétion de certaines cathepsines a été observée à un stade tardif de la maladie (Liotta et al., 1980). C'est le cas par exemple, des cathepsines D et B dans les lignées cellulaires de cancer du sein (Capony et al., 1989; Montcourrier et al., 1990; Yan et al., 1998). La cathepsine D est

impliquée dans plusieurs mécanismes de la progression cancéreuse comme l'angiogénèse des tumeurs et la prolifération des cellules cancéreuses (Liaudet-Coopman et al., 2006).

#### 4. 2. 2. Fonctions spécialisées

Certaines cellules spécialisées ont, en plus des lysosomes « classiques », des compartiments fonctionnels spécifiques qui partagent les caractéristiques des lysosomes et qui sont appelés « organites dérivés des lysosomes » (LRO pour Lysosome-Related Organelles). Les LRO partagent certaines caractéristiques des lysosomes à des degrés plus ou moins proches, comme un pH intraluminal acide et la présence de protéines lysosomales classiques. Ces granules, parfois appelés lysosomes de sécrétion, sont présents dans de nombreux types cellulaires, en particulier dans les cellules des lignées hématopoïétiques (Tableau 1). Ils peuvent sécréter leur contenu par exocytose sous l'effet d'un stimulus pour libérer des molécules effectrices.

**Tableau 1. Les organites dérivés de lysosomes (LRO)**

Organite	Distribution tissulaire	Fonction physiologique
Mélanosomes	Mélanocytes, cellules épithéliales du pigment de la rétine	Synthèse, stockage et transfert de la mélanine
Granules denses des plaquettes sanguines	Plaquettes sanguine, mégakaryocytes	Libération d'ATP, d'ADP de sérotonine et de calcium pour la coagulation sanguine
Corps lamellaires	Cellules épithéliales de type II des poumons	Synthèse et sécrétion de surfactant pulmonaire
Granules lytiques	Lymphocytes T cytotoxiques, cellules natural killer	Destruction des cellules cancéreuses ou infectées par un virus
Compartiments du CMHII	Cellules présentatrices de l'antigène (cellules dendritiques, lymphocytes B, macrophages, etc)	Apprêtement et présentation des antigènes aux lymphocytes T CD4+
Granules des basophiles	Basophiles, mastocytes	Libération stimulée d'histamines et d'autres agents d'inflammation
Granules des azurophiles	Neutrophiles, éosinophiles	Libération d'agents d'inflammation et anti-microbiens
Granules des ostéoclastes	Ostéoclastes	Résorption et remodelage osseux
Corps de Weibel-Palade	Cellules endothéliales	Maturation et libération régulée du facteur de von Willbrand dans le sang
Granules alpha des plaquettes sanguines	Plaquettes sanguines, mégakaryocytes	Libération de facteur de von Willbrandt et de fibrinogène pour l'adhésion des plaquettes et la coagulation sanguine.

D'après (Marks and Seabra, 2001)

## 5. Les maladies lysosomales

Plus de 40 maladies lysosomales différentes sont répertoriées. Elles affectent environ une naissance sur 8000 dans le monde. Ces maladies sont également appelées « maladies de surcharge » car l'activité déficiente d'une protéine lysosomale entraîne l'accumulation intra-lysosomale d'un métabolite non dégradé ou d'un produit non dégradé. Les maladies lysosomales sont dues à une mutation sur un gène codant pour une protéine lysosomale ou pour une activité enzymatique responsable de modifications post-traductionnelles essentielles à certaines protéines lysosomales (par exemple, la maladie ICD). Elles peuvent également être provoquées par une protéine dont la fonction concerne la biogenèse ou le transport des endosomes tardifs/lysosomes. Il s'agit par exemple de la maladie de Danon (déficience en LAMP-2) ou de la forme de lipofuscinose cérébrale neuronale impliquant CLN3 (Luiro et al., 2004). Les maladies sont classées en fonction des substances accumulées : par exemple, les sphingolipidoses, les mucopolysaccharidoses, les mucopolysaccharidoses, les maladies de surcharge en glycogène ou en glycoprotéines. Il existe une grande variabilité des symptômes : certaines maladies affectent gravement le système nerveux central, d'autres ne touchent que les tissus périphériques. Les symptômes sont le grossissement des organes, une déficience cardiaque, des myopathies, un retard mental. Il existe différents niveaux de sévérité dans une maladie donnée, pouvant aller jusqu'au décès à un âge précoce. La sévérité de la maladie dépend du type de mutation dans le gène, à savoir si la protéine déficiente est totalement inactive ou présente une activité résiduelle. Elle dépend aussi des organes ou cellules qui sont le plus affectés. L'accumulation d'un métabolite non dégradé dérégule un certain nombre de voies cellulaires : la signalisation intracellulaire, les voies biochimiques secondaires, l'expression génique (Futerman and van Meer, 2004).

Les traitements des maladies lysosomales visent soit à soigner les symptômes, soit à agir sur la cause. Les thérapies employées sont les transplantations de moelle osseuse, les traitements enzymatiques substitutifs de l'enzyme déficiente, les traitements avec des « chaperones pharmacologiques » et la thérapie génique. La greffe de moelle osseuse est la première thérapie efficace pour soigner les maladies de surcharge lysosomales. Elle repose sur les travaux de Neufeld et al. (Neufeld et al., 1977) et l'application de la correction croisée : la moelle osseuse d'un donneur sain, source de cellules souches hématopoïétiques, est injectée par voie intraveineuse au malade. Les cellules souches vont sécréter des enzymes lysosomales, dont celle qui est déficiente chez le malade, et les cellules du malade captent par endocytose cette source externe d'enzyme fonctionnelle. Cette thérapie a soigné des enfants

atteints de la maladie de Hurler (une mucopolysaccharidose de type I, avec une déficience en  $\alpha$ -L-iduronidase) ou de la maladie de Krabbe (déficience en galactocérébrosidase). Comme les cellules transplantées passent la barrière hémato-encéphalique, les syndrômes neurologiques sont également stabilisés et réduits. En revanche, cette thérapie ne guérit pas les symptômes des os (déformation, fragilité) car les cellules osseuses sont trop isolées pour être en contact avec les cellules greffées (Malatack et al., 2003).

Le traitement enzymatique de substitution consiste à injecter régulièrement une enzyme recombinante active comportant du M6P. Ainsi, la maladie de Fabry, une glycosphingolipidose provoquant une accumulation de globotriaosylcéramide dans les organes, est soignée par l'administration bi-hebdomadaire d' $\alpha$ -galactosidase A recombinante, produite à échelle industrielle en cellules d'ovaires de cobaye (CHO pour Chinese Hamster Ovary) (Desnick and Schuchman, 2002; Ioannou et al., 1992). Cependant, une telle thérapie ne soigne pas les symptômes affectant le système nerveux central car ces enzymes exogènes ne traversent pas la barrière hémato-encéphalique.

La thérapie par les chaperones pharmacologiques soigne les maladies dues à un mauvais repliement de l'enzyme, par injection des petites molécules chaperones qui vont stabiliser la protéine en cours de repliement. Ce traitement permet par exemple de soigner la variante cardiaque de la maladie de Fabry, où l' $\alpha$ -galactosidase A déficiente est peu stable, et n'a une activité résiduelle que de 1-10 %. Le galactose se lie au site actif de l'enzyme en cours de synthèse dans le RE et favorise son repliement correct et sa stabilité (Frustaci et al., 2001).

La thérapie génique est la thérapie la plus prometteuse pour soigner les maladies lysosomales, comme d'autres maladies métaboliques. Son avantage réside dans le fait qu'il n'y a plus besoin de trouver un donneur sain et compatible. A ce jour, des méthodes de transfert de gène *ex vivo* et *in vivo* sont développées. Les méthodes de transfert de gène *ex vivo* consistent à prélever des cellules du patient, à les modifier génétiquement et à les réimplanter au patient. Dans les méthodes *in vivo*, le plasmide codant pour une protéine fonctionnelle est directement délivré dans un organe. Ces thérapies reposent sur le développement de vecteurs viraux, c'est-à-dire des vecteurs recombinants dépourvus des gènes viraux pathogènes, mais qui permettent de copier le mécanisme utilisé par les virus pour infecter les cellules. Ces thérapies sont également développées pour franchir la barrière hémato-encéphalique et atteindre les cellules du cerveau. Récemment, des injections intracrâniennes de vecteurs de type AAV (Adeno-Associated Virus) codant pour l' $\alpha$ -L-iduronidase ont été administrées à des chiens atteints du symptôme de Hurler (mucopolysaccharidose de type I) et ont permis une réduction drastique

des lésions anatomiques du cerveau et une disparition des marqueurs biochimiques de la maladie. Ainsi, il est envisagé de l'appliquer à des enfants atteints de cette maladie (Ciron et al., 2006).

### **III . IDENTIFICATION DE p76**

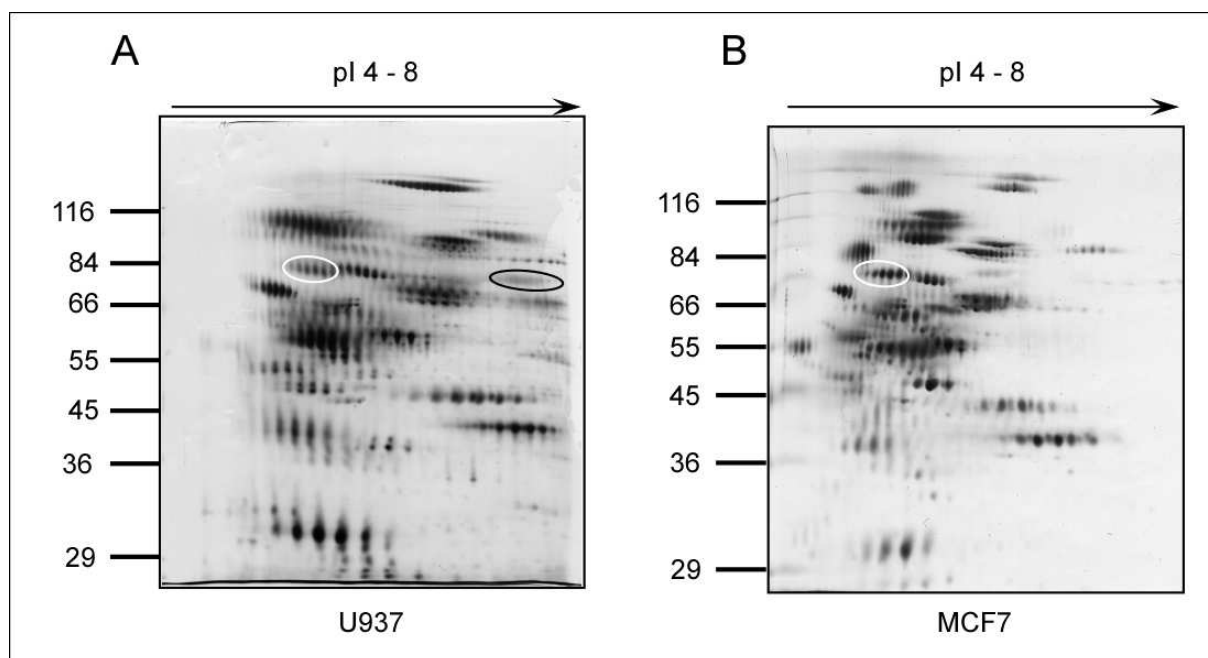
#### **1. Données de spectrométrie de masse**

La protéine p76 humaine a été identifiée au laboratoire au cours d'analyses protéomiques de protéines solubles porteuses de sucre M6P. Ces protéines ont été purifiées à partir des lignées cellulaires de monocytes U937 (Journet et al., 2000) et de cancer du sein MCF7 (Journet et al., 2002). La sécrétion des précurseurs des protéines lysosomales solubles dans le surnageant de culture a été provoquée par l'ajout de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . L'augmentation du pH dans les compartiments de la voie endocytaire induite par cette base faible empêche la dissociation entre les récepteurs et leur ligand, en particulier entre les MPR et les protéines M6P. Les récepteurs saturés ne peuvent plus prendre en charge les protéines néosynthétisées ; celles-ci sont alors sécrétées dans le surnageant. Pour isoler les protéines M6P, le surnageant de culture ainsi obtenu a été purifié par chromatographie d'affinité sur une colonne sur laquelle du CI-MPR soluble bovin (sCI-MPR) a été immobilisé. Les protéines M6P ont été éluées spécifiquement par du M6P exogène. Elles ont ensuite été séparées sur un gel d'électrophorèse en deux dimensions (2D), colorées au bleu colloïdal, digérées par la trypsine et identifiées par spectrométrie de masse (Figure 7).

Plusieurs peptides de hp76 ont été trouvés dans les deux types d'échantillons : certains ont été séquencés par spectrométrie de masse en tandem (MS/MS), d'autres caractérisés grâce à la mesure de leur masse par MALDI-TOF. A la date des analyses, ces peptides correspondaient à un EST. Par la suite, la protéine déduite de cette séquence a été nommée « hypothetical protein LOC196463 » (banque de données NCBI).

Dans le profil des protéines M6P séparées sur le gel 2D, hp76 a été trouvée majoritairement dans une série de spots de pI acide (vers pH 5), à la masse moléculaire de 76 kDa, ce qui a déterminé son nom (Figure 7). Dans une autre série de spots peu intenses du gel 2D des protéines M6P purifiées à partir des cellules U937, un peptide de p76 a été identifié à pI basique (vers pH 7-8) et à la masse moléculaire 70 kDa (Figure 7A). Il s'agit du peptide LASDGATWADIFK (résidus 355 à 367 de LOC196463).





**Figure 7. Gels 2D des protéines M6P purifiées et position de hp76 déterminée par les analyses en spectrométrie de masse.**

Les protéines purifiées M6P équivalentes au surnageant de (A) 2,5 milliards de cellules humaines monocytaires U937, séparées sur un gel 20x20cm (gradient de pH linéaire 4 à 8, 10% d'acrylamide) et colorées au bleu colloïdal, et (B) 175 millions de cellules tumorales de cancer de sein MCF7, séparées sur un mini-gel 9x9cm et colorées à l'argent. Les cercles blancs indiquent les spots où hp76 a été identifiée majoritairement, et celui en noir indique un spot où un seul peptide de hp76 a été trouvé.

D'autres analyses de ces échantillons ont été effectuées à partir d'échantillons séparés sur un gel SDS-PAGE en une seule dimension. Dans les échantillons U937, sept autres peptides de p76 ont été identifiés, améliorant le pourcentage de couverture de la séquence de hp76. Dans les échantillons MCF7, neuf peptides supplémentaires ont été identifiés (Tableau 2).

**Tableau 2. Peptides de hp76 identifiés lors des analyses de spectrométrie de masse.**

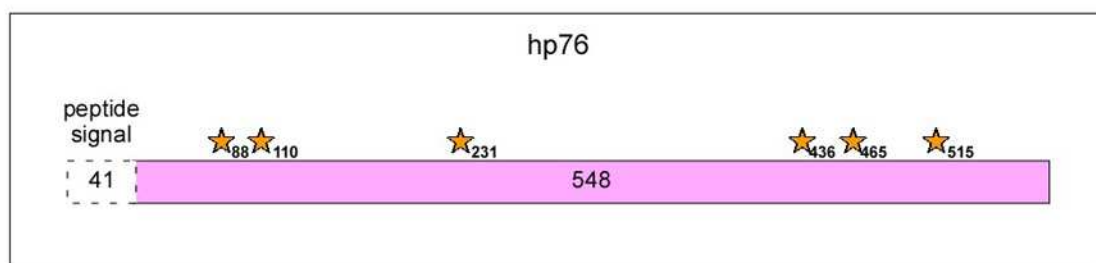
Séparation	Lignée cellulaire	Peptides identifiés <sup>a</sup>	Technique de MS utilisée	Score Mascot	Couverture de la séquence
2DE	U937	SVLLDVSAGQLLMVDGR (63-79) VLTILEQIPGMVVVADK (397-413)	LC-MS/MS	147	6%
2D	MCF7	DGQVPPASR (52-60) GLEDSYEGR (191-199) IKPSLGSGSCSALIK (235-249) YWLQFR (277-282) EGPWGDYPLVPGNK (283-296) NPALWK (330-335) GCVLEWVR (341-348) LASDGATWADIFKR (355-368) AFIPGGPSPGSR (385-396) YNDFLHDPLSLCK (481-493) ACNPQPNGENASAR (494-508)	MALDI-TOF	133	20%
1DE	U937	GLEDSYEGR (191-199) YWLQFR (277-282) EGPWGDYPLVPGNK (283-296) GCVLEWVR (341-348) LASDGATWADIFKR (355-368) FNSGTYNQWMIVDYK (369-384) AFIPGGPSPGSR (385-396)	LC-MS/MS	404	13%
1DE	MCF7	GLEDSYEGR (191-199) KYWLQFR (276-282) EGPWGDYPLVPGNK (283-296) GCVLEWVR (341-348) LASDGATWADIFK (355-367) FNSGTYNQWMIVDYK (369-384) AFIPGGPSPGSR (385-396) ACNPQPNGENASAR (494-508) VTMSLAR (535-542)	LC-MS/MS	633	17%

<sup>a</sup> la numérotation des acides aminés correspond à celle de LOC196463.

## 2. Description du gène et de la protéine « p76 »

Le gène *loc196463* codant pour hp76 est situé sur le chromosome 12 humain. Douze exons sont prédits, générant un ARN messager de 2584 paires de bases (pb). La séquence de l'ADNc correspondant à p76 a été répertoriée dans NCBI sous le numéro d'accès NM\_173542. La séquence en 5' non codante est de 28 pb ; la séquence en 3' non codante est complète, avec 789 pb et une queue poly(A). Le cadre ouvert de lecture comprend 1767 pb.

La protéine codée par ce gène comporte 589 acides aminés, dont les 41 premiers correspondent à un peptide signal prédit. Sa masse moléculaire théorique est de 61 kDa et son pI de 6,2. Six sites de N-glycosylations sont prédits (Figure 8).



**Figure 8. Représentation schématique de la protéine p76 humaine (hp76).**  
La protéine a un peptide signal prédit de 41 acides aminés, 6 sites potentiels de N-glycosylations (étoiles). Le reste de sa séquence ne comporte aucun domaine fonctionnel connu.

Les recherches d'homologies de séquence en utilisant le logiciel BLAST montrent que des protéines de séquence homologue à hp76 existent dans le règne animal (mammifères, poisson, poule, drosophile, nématode) mais sont absentes parmi les procaryotes, les plantes ou les levures (Tableau 3).

**Tableau 3. Protéines de séquence similaire à p76 humaine.**

Espèce	% identité <sup>a</sup>	Longueur de la protéine (nombre d'acides aminés)
<i>Homo sapiens</i> (LOC196463)	100% (589)	589
<i>Pan troglodytes</i> (XP_509397.2)	98% (539)	539
<i>Bos taurus</i> (LOC514347)	83% (585)	585
<i>Mus musculus</i> (LOC71772)	82% (558)	594
<i>Rattus norvegicus</i> (LOC246120, complétée)	82% (547)	585
<i>Tetraodon nigroviridis</i> (CAG0854)	62% (332)	527
<i>Strongylocentrotus purpuratus</i> (XP_78031)	56% (269)	289
<i>Caenorhabditis elegans</i> (Y37D8A.2)	44% (513)	571
<i>Dictyostelium discoideum</i> (XP_645818.1)	37% (516)	572
<i>Trypanosoma brucei</i> (XP_844855)	28% (562)	659
<i>Drosophila melanogaster</i> (CG10645)	28% (416)	658

<sup>a</sup>Le nombre entre parenthèse représente la longueur de la séquence sur laquelle le pourcentage d'identité a été calculé.

Ces protéines sont regroupées et décrites comme ayant un domaine «laminin A ». Malgré des essais d'alignements de séquence entre hp76 et des sous-unités de laminines (grosses protéines de la matrice extracellulaire de plusieurs centaines de kDa, ayant 14 isoformes et 3 sous-unités), aucune homologie de séquence entre p76 et ces protéines n'a été trouvée (Morgan et al, 2004). Cette dénomination de domaine «laminin A » proviendrait de la première identification du gène codant pour la protéine homologue de p76 chez la drosophile, qui avait été nommé *lama* pour *lamina ancestor* (Perez and Steller, 1996), car isolé à partir du premier ganglion optique ou lamina. Ainsi, il semblerait qu'un amalgame entre « lamina » et « laminin A » soit à l'origine de cette appellation.

Parmi les protéines de séquence homologue à hp76, la seule ayant une fonction démontrée expérimentalement est celle de l'amibe *Dictyostelium discoideum*, récemment décrite comme étant une phospholipase B (Dd-PLB)(Morgan et al., 2004). Les sites actifs de lipases sont constitués de trois résidus conservés : sérine, aspartate et histidine, avec la sérine présente dans un pentapeptide « GX SXG » conservé (X étant un acide aminé quelconque)(Schrag and Cygler, 1997). La séquence de Dd-PLB ne contient pas ce pentapeptide. Cependant, il existe au moins un autre mécanisme catalytique, par exemple, pour les PLB bactériennes et la PLA2 cytosolique, qui implique une diade catalytique avec une sérine et un aspartate, qui ne sont pas présent dans un peptide consensus (Dessen et al., 1999). Les auteurs en déduisent ainsi que la Dd-PLB forme une nouvelle famille de lipases, et notent que dans la séquence la plus conservée des protéines homologues de la Dd-PLB, un résidu sérine est présent (la séquence NSGTYNNQW, cf Figure 9, séquence surlignée en jaune) qui pourrait bien être la sérine catalytique. Cette séquence conservée est présente dans hp76. Par ailleurs, hp76 et mp76 présentent un pentapeptide « GX SXG » (Figure 9, séquence surlignée en rose).

hp76	1	MVQOMYCYPGSHIARALRALA-----LVALLVGFFLSGLAGAPAPGGWARDQVPPASRSRVLDDVSAGQLMVDGRHPDAVAVANLTNAIRETGWAFLELQTS--GQYNDLSIQ
mp76	1	MAAPVDGSSGWAARALRALALSLTIALLASLITGLLSSGAPAGALPTLPGCMQQRQNPDPVSRTRILLDDASGQLRLDGGPHDPDAVAVANLTNAIRETGWAYLDLSTN--GRYNDLSIQ
rp76	1	MAAPMDRTHGGRAARALRALA-----SLAGLLISGLAGALPTLPGCWRRQNPPEPPASTRSLILLDDASGQLRLDGGPHDPDAVAVANLTNAIRETGWAYLDLQTN--GSTYNDLSIQ
DdPLB	1	-----MVIRSLILLT-----IAIIGSVLS-----QSS-----IDDGTVFYSGPDNYVYKPGTFSNGVAQAIFSNEMMTGWSEFMSISSESGLYPNDII
consensus	1	.....*
hp76	115	AVAAGVVEAAVSEELIYMHWNNTVNYCGPEYEVGYCERLKFLEANLEWMQEMESNP--DSPYWHQVRLTLQLKGLSDSYEGRYVFP--AGKFTIKPLGLFLLQLSGDLEDLELAIN
mp76	120	AVAAGVVEASVSEELIYMHWNNTVNYCGPEYEVGYCEKLFLEANLEWMQEMELNP--DSPYWHQVRLTLQLKGLSDSYEGRLTFP--TGRFTIKPLGLFLLQLSGDLEDLELAIN
rp76	111	AVAAGVVEASVSEELIYMHWNNTVNYCGPEYEVGYCEKLFLEANLEWMQEMELSP--DSPYWHQVRLTLQLKGLSDSYEGRLTFP--TGRFTIKPLGLFLLQLSGDLEDLELAIN
DdPLB	81	AAGAGYLEGYSIQEMIYQNMWNNYNN-----EYHNVIGSDVENWIQENLYQLTMIDSDAPSNLDYQWQVETVLTQITYMQRGYNQSVINDNGVDASQSLGITFFFLNMMDGMDIDLGPALN
consensus	121	*.....*
hp76	232	KTKIKPSLG-----SGSCSALIKLLPGQSDLLVAHNTWNNYQHMRLVIKKYWLQFREGPWGDYPLVPGNKLVFSSYPGTIFSCDDFYILGSLVLTLETTIGNKNPALM
mp76	237	KYNTKPSLG-----SGSCSALIKLLPGGHDLLVAHNTWNSYQNMRLRIKKYRLQFREGQOEYPLVAGNNLVFSSYPGTIFSGDDFYILGSLVLTLETTIGNKNPALM
rp76	228	KYNTKPSVG-----SGSCSALIKLLPGSHDLVAHNTWNSYQNMRLRIKKYRLQFREGQOEYPLIAGNNLVFSSYPGTIFSGDDFYILGSLVLTLETTIGNKNPALM
DdPLB	196	LTNGKQVTSPTATSPKQAFKEFMRRTGHCCHSALIKMTDDLSLFSGHTTWSSYEMVRMFKYNNLKYLENGQP-----PASKVTMFGSGYPGTSLSIDDFYLLDTKIVIVETTTGLMNNLIY
consensus	241	*.....*
hp76	335	KYVRPGCVLEWVRNIVANRLASDGTWADIFKRFNSGTNNQMMIYDVKAFIPGSPSGSRVLTILEQIPGMVVVADKTSLEYQKTYWASYNIPSEFTVFNASGLQALVAQYGDWFSYD
mp76	340	KYVQPGCVLEWVRNIVANRLALDGTWADVFRKFNSTNNQMMIYDVKAFIPNGSPSGSRVLTILEQIPGMVVVADKTAELYKTYWASYNIPYFETVFNASGLQALVAQYGDWFSYT
rp76	331	KYVQPGCVLEWVRNIVANRLALDGTWADVFRKFNSTNNQMMIYDVKAFIPNGSPSGSRVLTILEQIPGMVVVADKTAELYKTYWASYNIPYFESVFNPSGLQALVAQYGDWFSYT
DdPLB	312	HLITS--ESVLSWIRVIVANRLATGESWCQFSLYNSGTNNQMMIYDYNKFKIGYALDGLD--TLVILEQVDPYVEYGDQTAALRTG--YWPSENIPEYENIYGLTGENETAYQFGWFSYQ
consensus	361	.....*
hp76	455	GSPRAQIFRRNQSLVDMDSWRLMRVNDFLHDFLSLCKACNPQNGENAIARSDDLNPANGSYPFKALRQRSHGGIDVKVTSMSLARILSLLAASGPTWDQVPPQWSTSPFSGLLHMG
mp76	460	KNPRAKIFORDQSLVEDMDAMVRLMRVNDFLHDFLSLCEACNPKPAENAIARSDDLNPANGSYPFQALHQRAGHGIDVKVTSFLAKYMSMLAASGPTWDQCPFPQWSKSPFHHMLHG
rp76	451	RNPRAKIFORDQSLVEDVTWRLMRVNDFLHDFPSLCEACSKPKPAENAIARSDDLNPANGSYPFQALRQRAGHGIDVKVTSVALAKYMSMLAASGPTWDQLPFPQWSKSPFHHMLHS
DdPLB	429	ASPRSMIFKRDANNIHSITQFQMLRYNNWQNDP-----FSQAGNAGQISSRFDLVTD--DPNNQVILDPAFGGIDSKVVSADWVAALLVNAQSGSPSHDNETPFTWNSQWNQKYTAG
consensus	481	***.....*
hp76	575	QDLMKFAFVKVSWD-----
mp76	580	QDLMWFSPIRVFD-----
rp76	571	QDLMWFSPIRVFD-----
DdPLB	541	QPTTNFDMWMSLQSMKPAFSSDSSDSTTFN
consensus	601	*.....*.....*

Figure 9. Alignement des séquences de hp76 (p76 humaine), mp76 (p76 de souris), rp76 (p76 de rat) et de Dd-PLB (phospholipase B de *D. discoideum*).  
La séquence surlignée en jaune correspond au peptide le plus conservé entre ces séquences. Les résidus en rose correspondent au pentapeptide « GX SXG » (cf texte).

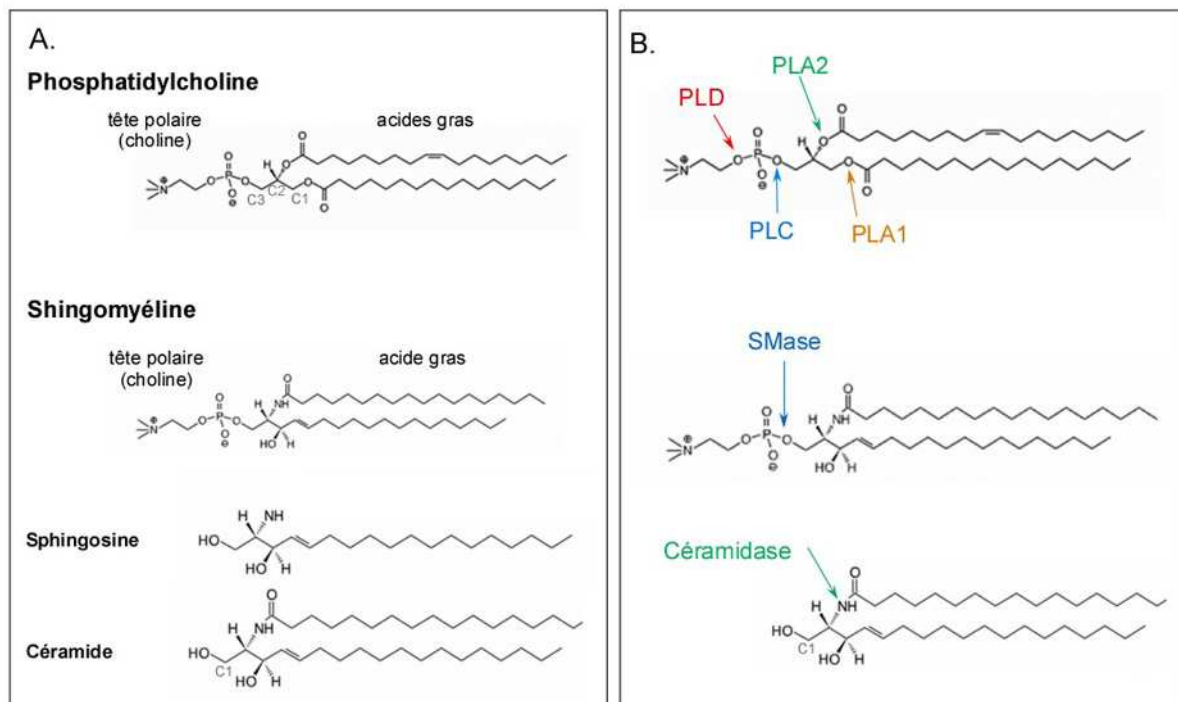
## IV . LES PHOSPHOLIPIDES ET LES PHOSPHOLIPASES

L'homologie de p76 avec une phospholipase B nous a incité à explorer le domaine des phospholipides et des activités de type phospholipases.

### 1. Structure des phospholipides

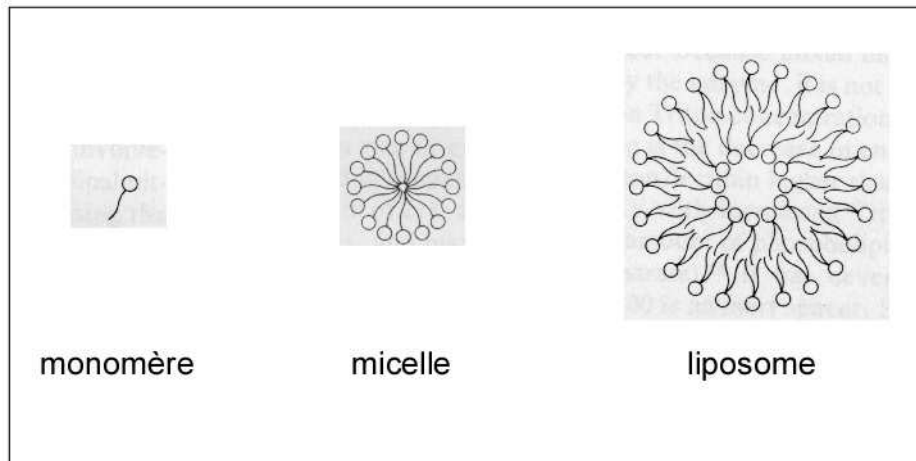
Un phospholipide (Figure 10A) est formé à partir d'une molécule de glycérol, dont deux groupements hydroxyles sont estérifiés avec deux chaînes d'acide gras. La chaîne d'acide gras en carbone 2 du glycérol, appelé également *sn-2* (pour stereospecifically numbered-2) est fréquemment un acide gras insaturé, formant un coude, alors que celui en carbone 1 du glycérol (ou *sn-1*) est fréquemment saturé. Le groupement hydroxyle en *sn-3* est, lui, estérifié par l'acide phosphorique, créant ainsi une tête polaire. Un tel phospholipide est un acide phosphatidique. Le groupement phosphate peut former une autre liaison ester avec un groupement choline, éthanolamine, sérine, glycérol ou un sucre de type inositol. Le phospholipide est alors nommé phosphatidylcholine (PC, Figure 10A), phosphatidyléthanolamine (PE), phosphatidylsérine (PS), phosphatidylglycérol (PG) ou phosphatidylinositol (PI), respectivement.

Il existe un autre composant important des membranes : la sphingomyéline. Elle n'est pas un phospholipide *stricto sensu* dans sa composition moléculaire, mais elle a la même structure que la phosphatidylcholine. La molécule de base qui la compose est une sphingosine (Figure 10A). Un céramide est une sphingosine avec un acide gras lié par une liaison amide (au lieu d'une liaison ester dans les phospholipides) (Figure 10A). La sphingomyéline est alors un céramide avec une tête polaire (un pont phosphodiester avec un groupement choline). Il existe de nombreux composés lipidiques ayant comme unité de base le céramide : les glycosphingolipides, comme les cérébrosides, les glycolipides neutres, les gangliosides. Ils sont dotés d'un groupement, polaire ou non, formé par un ou plusieurs sucres en C1 du céramide.



**Figure 10. Phospholipides, sphingomyéline et phospholipases, sphingomyélinase et céramidase.**  
 (A) Structure de la phosphatidylcholine et de la sphingomyéline. L'unité de base des phospholipides est une molécule de glycérol, dont les atomes de carbones sont numérotés C1, C2 et C3. L'unité de base de la sphingomyéline est une sphingosine. Le céramide est une sphingosine avec un acide gras lié par une liaison amide. (B) Sites de clivage des phospholipides par les phospholipases A (PLA1 et PLA2), C (PLC) et D (PLD) et sites de clivage de la sphingomyéline par la sphingomyélinase (SMase) ou la céramidase.

Un phospholipide (ou une sphingomyéline) est donc une molécule amphiphile, avec une tête polaire et une queue hydrophobe et apolaire. Dans une phase aqueuse, les queues hydrophobes des phospholipides se regroupent, avec les têtes polaires à l'interface. Ils forment ainsi des micelles ou des liposomes, qui sont des vésicules de taille variable, en bicouches ou multilamellaires (Figure 11). Ce principe fait des phospholipides les constituants essentiels des membranes cellulaires. La composition en phospholipides dans les membranes cellulaires varie selon l'organite, et leur répartition est asymétrique entre les feuillets externe et interne. Par exemple, dans la membrane plasmique, la PC et la sphingomyéline sont les phospholipides les plus abondants sur le feuillet externe, alors que le feuillet interne contient majoritairement des PS et PE (Zachowski, 1993).



**Figure 11. Assemblage des phospholipides.**

Un monomère de phospholipide est représenté avec sa tête polaire (cercle) et une queue hydrophobe (trait). Les phospholipides peuvent s'assembler en micelle ou en liposome. Celui-ci est représenté ici simplement comme une vésicule bicouche. Les liposomes sont très divers, ils peuvent être plus gros, multilamellaires, former des compartiments concentriques.

## **2. Fonction générale des phospholipides**

Les phospholipides membranaires ont longtemps été considérés comme des composés « inertes » servant uniquement à la compartimentation des systèmes biologiques.

Cependant, cette idée est largement dépassée aujourd'hui, tant les exemples sont nombreux de leur implication dans les mécanismes cellulaires : l'externalisation de la PS sur le feuillet externe de la membrane plasmique est un marqueur des cellules apoptotiques spécifiquement reconnu par les phagocytes (Martin et al., 1995). Les radeaux lipidiques, riches en sphingolipides et en cholestérol, sont des plateformes impliquées dans la signalisation cellulaire. Le phosphatidylinositol, qui peut être phosphorylé en trois positions sur son inositol, implique un rôle différent pour ce phospholipide à chaque combinaison de phosphorylations possible. Par exemple, le PIP3 (phosphatidylinositol 3-monophosphate) est abondant à la surface des endosomes précoces et interagit spécifiquement avec la protéine EEA1 ; le PI(4,5)P2 est abondant à la membrane plasmique où il intervient pour la formation des puits couverts de clathrine (Ford et al., 2002).

Par ailleurs, les structures différentes des lipides et phospholipides sont directement impliquées dans la courbure des membranes, et ont donc leur importance dans les remodelages membranaires (fusion, invagination de membranes). Par exemple, l'acide arachidonique a une forme de cône, alors que l'acide lysophosphatidique est un lysophospholipide en forme de cône inversé. Ainsi, lors de la formation de la vésicule de



clathrine, une enzyme, l'endophiline A1, catalyse l'acylation de l'acide lysophosphatidique par un acide arachidonique, formant alors un acide phosphatidique, qui a la forme d'un cylindre. Il est proposé que ce changement de la forme des phospholipides soit à l'origine du passage d'une courbure positive de la membrane plasmique à une courbure négative, au niveau du col de la vésicule (Huttner and Schmidt, 2000).

### 3. Les phospholipases

Les phospholipases sont les enzymes qui clivent les phospholipides. Elles jouent un rôle central dans la digestion des phospholipides du bol alimentaire et dans la synthèse et le renouvellement des membranes cellulaires. Leur rôle est également primordial dans les processus de transduction du signal, où les produits libérés servent de messagers cellulaires.

Les phospholipases sont classées selon le site de clivage du substrat phospholipidique en phospholipases A, B, C et D (Figure 10B). En plus de cette régiospécificité, les phospholipases ont des spécificités plus ou moins large envers les têtes polaires ou les chaînes d'acides gras.

Les phospholipases A (PLA) clivent la liaison ester au niveau des acides gras, libérant un acide gras et un lysophospholipide. La PLA1 (E.C.3.1.1.32) clive la liaison en position *sn-1* du phospholipide ; la PLA2 (E.C.3.1.1.4) clive celle en position *sn-2*. Les PLA2 sont plus nombreuses et mieux caractérisées que les PLA1. Il existe des PLA2 sécrétées (pancréatiques ou de venins de serpent, types I à IV) ou intracellulaires (cytosoliques (dépendantes du  $\text{Ca}^{2+}$ ) ou dites «  $\text{Ca}^{2+}$  indépendantes », types V à VII). Les PLA2 sont impliquées dans de très nombreux processus, par exemple la médiation de la réponse inflammatoire, l'agrégation plaquettaire, la contraction des muscles lisses. Leur réaction libère de l'acide arachidonique, un acide gras à 20 atomes de carbone avec 4 insaturations, qui est le précurseur des leucotriènes, des prostaglandines et autres eicosanoïdes, hormones locales présentes dans tous les organes et tissus.

Les phospholipases B (PLB) sont décrites de deux manières dans la littérature : une définition les décrit comme des lysophospholipases (E.C. 3.1.1.5) qui hydrolysent la deuxième liaison ester de lysophospholipides, après une hydrolyse par une PLA (Wang and Dennis, 1999). L'autre définition, qui est la plus répandue, décrit les PLB comme des hydrolases qui ont une activité PLA et lysophospholipase, libérant alors deux acides gras et un glycérophospholipide (Delagebeaudeuf et al., 1998; Maury et al., 2002; Takemori et al., 1998). La PLB de mammifère est une ectoenzyme exprimée dans les épithélia, dont les

fonctions seraient diverses : son rôle dans la bordure en brosse des intestins serait la digestion terminale des phospholipides (Diagne et al., 1987; Gassama-Diagne et al., 1992) et de la vitamine A (Rigtrup et al., 1994). Dans l'épiderme, elle serait responsable de la production des acides gras, importants dans la fonction de barrière de la couche cornée supérieure (Maury et al., 2002). Egalement présente dans l'épididyme, la PLB jouerait un rôle dans la maturation du sperme (Delagebeaudeuf et al., 1998).

Les phospholipases C et D (PLC, E.C. 3.1.4.3 et PLD, E.C. 3.1.4.4), la sphingomyélinase (E.C. 3.1.4.12) et la céramidase (E.C. 3.5.1.23) sont des actrices de la transduction du signal : elles hydrolysent des PC, des PI et des sphingomyélines, et les produits de la réaction sont des messagers secondaires (par exemple, le diacylglycérol), des facteurs mitogènes (par exemple, l'acide lysophosphatidique) ou des médiateurs de l'apoptose (par exemple, la sphingosine).

Les phospholipases sont des enzymes solubles, à l'inverse de leur substrat. On observe un phénomène d'activation interfaciale de ces enzymes : elles sont très actives lorsque la concentration en substrat est supérieure à la concentration micellaire critique (la CMC), c'est-à-dire lorsque les phospholipides forment des structures organisées. L'adsorption d'une phospholipase sur une membrane est ainsi dépendante de la « qualité » de l'interface, régie par la composition en phospholipides, le pH environnant, la présence de sels ou de cofacteurs. Les produits générés par les phospholipases peuvent être hydrophiles, hydrophobes ou amphiphiles, ce qui modifie en retour la qualité de l'interface et donc l'activité de ces enzymes (Verger, 1980).

#### **4. Les phospholipases lysosomales**

Les phospholipases lysosomales ne sont pas encore très bien caractérisées aujourd'hui au niveau moléculaire. Pourtant, la description biochimique de ce type d'activité remonte à 1967 où une activité de type « phospholipase B » lysosomale optimale au pH 4,5 et indépendante du calcium a été décrite dans la fraction soluble de lysosomes purifiés à partir de foie de rat (Mellors and Tappel, 1967). De nombreuses autres activités phospholipases A et B lysosomales ont été décrites biochimiquement, obtenues par de nombreuses étapes de fractionnement et de purification réalisées à partir de fractions enrichies en lysosomes. Par exemple, une activité phospholipase A1 lysosomale, isolée de foie de rat, a été bien caractérisée tant au niveau de son activité (indépendante du  $\text{Ca}^{2+}$ , activée par le Triton X-100 et les lipides chargés négativement) que des espèces protéiques impliquées (glycoprotéines de

90, 44, 34, 24 et 15 kDa)(Hostetler et al., 1982; Piret et al., 2005). Il semble que le gène codant pour cette protéine ne soit toujours pas cloné, ni la séquence de la protéine référencée dans les banques de données. Aujourd'hui, seules deux phospholipases lysosomales ont été clonées et caractérisées :

Une enzyme, appelée PLA2 lysosomale/ACS (pour 1-O-AcylCeramide Synthase) est référencée comme la lysophospholipase A3 dans Swiss-Prot (alors qu'il a été montré expérimentalement qu'elle n'avait pas d'activité lysophospholipase)(Hiraoka et al., 2002)). Cette enzyme de 40 kDa a une double activité transacylase du céramide et PLA2 indépendante du calcium (Abe and Shayman, 1998; Hiraoka et al., 2002). Sa localisation lysosomale n'a pas été démontrée expérimentalement, mais elle est suggérée par l'optimum d'activité à pH acide. Elle est très fortement exprimée dans les macrophages alvéolaires, ce qui en fait un acteur important dans la dégradation du surfactant pulmonaire (Abe et al., 2004). Les souris K.O. pour ce gène développent une phospholipidose, avec des inclusions lamellaires intracellulaires de phospholipides présentes dans les macrophages alvéolaires et péritonéaux. (Hiraoka et al., 2006). Cette enzyme a une forte homologie de séquence avec deux enzymes qui ne sont pas lysosomales : la Lecithin Cholesterol AcylTransférase (LCAT), qui estérifie le cholestérol plasmatique, et la Lecithin:cholestérol acyltransférase-Like lysoPhosphoLipase (LLPL) qui a une activité lysophospholipase (Taniyama et al., 1999).

Une autre phospholipase A2 lysosomale calcium-indépendante (aiPLA2) a été clonée (Kim et al., 1997). Elle porte également plusieurs noms : peroxiredoxine-6, 1-Cys peroxiredoxine (1-Cys PRX), antioxidant protein 2 ou Non-Selenium Glutathione Peroxidase (NSGPx). Cette protéine de 24 kDa spécifique des poumons et du cerveau a également une double fonction : à pH acide, elle a une activité PLA2 (mais pas d'activité PLA1) et à pH basique, elle a une activité peroxidase pour empêcher la peroxydation des phospholipides (Chen et al., 2000). Les souris K.O. pour ce gène présentent également une déficience au niveau de la dégradation des phospholipides pulmonaires (Fisher et al., 2005).

## V . OBJECTIFS DE LA THESE

Une partie des objectifs du laboratoire vise à faire progresser la compréhension de la « physiologie lysosomale ». Dans ce but, des analyses protéomiques ont été menées au laboratoire et ont permis la découverte de plusieurs protéines non caractérisées alors. L'approche par protéomique est récente et différente des approches classiques où une pathologie est à l'origine d'études sur les mécanismes moléculaires. Cependant, on peut faire le pari que les études sur des protéines nouvellement identifiées participeront également, à long terme, à la compréhension des mécanismes moléculaires physiologiques, et qu'elles seront peut-être corrélées à des maladies de surcharge encore non caractérisées, comme par exemple la dysplasie géléophysique, le syndrome de Yunis-Varon ou l'éthanolaminose.

La protéine p76, découverte au laboratoire, a été caractérisée dans le cadre de mon travail de thèse.

Notre objectif était d'abord de chercher à confirmer la localisation de p76. Alors que cette protéine a été identifiée parmi des protéines portant des sucres mannose-6-phosphate, il fallait vérifier si p76 portait véritablement des sucres de ce type et surtout, si elle était véritablement localisée dans les lysosomes.

En étudiant p76, il est apparu clairement qu'elle subissait une maturation protéolytique. Ainsi, nous avons également cherché à caractériser les étapes de maturation de p76, pour savoir quelles étaient les chaînes de la forme de mature de p76, et de quelle manière elles étaient associées.

Une autre interrogation concernait la fonction de cette nouvelle protéine soluble. Son homologie de séquence avec une phospholipase B de *Dictostelium discoideum*, ainsi que la confirmation de sa localisation dans un organe dont le rôle est d'hydrolyser toutes sortes de substrats nous a orienté vers la question suivante : p76 est-elle une phospholipase lysosomale ?



## **MATÉRIEL ET MÉTHODES**



# MATERIEL ET METHODES

## I. BIOLOGIE MOLECULAIRE

### 1. Clonage

La séquence d'ADN codant (ADNc) pour hp76 a été obtenue par RT-PCR (Reverse-transcription PCR) sur des ARNm purifiés à partir de cellules U937, avec les amorces F1/R1 (Tableau 4). La séquence d'ADNc de hp76 sans séquence signal et sans codon stop a été amplifiée avec les amorces F2/R2, digérée par *HindIII* et *XhoI* puis clonée dans le vecteur pFLAG-ATS (Sigma-Aldrich), préalablement coupé par *HindIII* et *XhoI*. Le plasmide résultant a été appelé pFLAG-hp76 et permet l'expression en bactérie de la protéine hp76 avec une étiquette FLAG à l'extrémité N-terminale (appelée FLAG-hp76).

Deux constructions ont été réalisées pour l'expression en cellules eucaryotes de la protéine chimère hp76-myc-His<sub>6</sub> (dite hp76-myc). L'ADNc de hp76 sans codon stop a été amplifié par PCR avec le couple d'amorces F1/R1. Après digestion par *HindIII* et *XhoI*, le produit de PCR a été cloné dans le vecteur pcDNA3.1/myc-His(+)-A (Invitrogen), également digéré par *HindIII* et *XhoI*, pour donner le plasmide pcDNA3.1/hp76-myc-His. L'ADNc codant pour la protéine de fusion a ensuite été amplifié par PCR à partir du plasmide pcDNA3.1/hp76-myc-His avec les amorces F3/R3, et cloné dans le vecteur d'expression pCEP4 (Invitrogen), digéré par *KpnI* et *XhoI*. Ce plasmide, appelé pCEP4/hp76-myc-His, a permis l'expression de hp76-myc dans les cellules humaines HEK 293-EBNA.

Une construction a été réalisée pour l'expression en cellules eucaryotes de la protéine chimère hp76-GFP. L'ADNc de hp76 sans codon stop a été amplifié par PCR avec le couple d'amorces F1/R5. Après digestion par *HindIII* et *KpnI*, le produit de PCR a été cloné dans le vecteur pEGFP-N3 (Clontech), digéré par *HindIII* et *KpnI*. Ce plasmide résultant a été appelé php76-GFP.

Un plasmide permettant l'expression de hp76 sans étiquette a été construit par insertion simultanée de deux fragments d'ADNc de hp76 (5' et 3') dans le vecteur pcDNA3.1 (Invitrogen), digéré par *KpnI* et *XhoI*. Le fragment 5' de hp76 a été purifié à partir du plasmide pCEP4/hp76-myc-His, coupé par *KpnI* et *BamHI*. Le fragment 3' de hp76 a été obtenu par la digestion d'un fragment de l'ADNc de hp76 amplifié par PCR (couple



d'amorces F4/R4) et digéré par *Bam*HI et *Xho*I. Ce plasmide résultant a été appelé pcDNA3.1/hp76.

Le plasmide pCMV-SPORT6/mp76 permettant l'expression de la protéine p76 de souris (mp76) a été obtenu auprès du RZPD (Deutsches Ressource Zentrum für Genomforschung) : sous le nom de clone IRAVp968E0290D6).

**Tableau 4. Amorces utilisées en PCR pour cloner p76. Les sites de restriction sont en italique.**

Nom de la paire	Forward primer	Reverse primer
F1/R1	GGA CAA <i>GCT</i> TAT GGT GGG CCA GAT GTA CTG C	GCA <i>TCT CGA</i> GGT CCC ATG AAA CCT TGA CAG G
F2/R2	ATA TAA <i>GCT</i> TAT CCC AGC GCC GGG GGG CCG CTG G	GCA <i>TCT CGA</i> GGT CCC ATG AAA CCT TGA CAG G
F3/R3	AGT <i>TGG TAC</i> CAA GGT TAT GGT GGG CCA GAT G	GCG CAA <i>GCT TTC</i> AAT GGT GAT GGT GAT GAT GAC C
F4/R4	CAG CGG CAC GTA TAA CAA CCA GTG G	GCA <i>TCT CGA</i> G TC AGT CCC ATG AAA CCT TGA CAG G

## 2. Analyse en Northern blot

Une membrane de Northern blot (Human 12 lanes MTN Multiple Tissue Northern Blot, Clontech), portant 1µg d'ARN poly(A)+ par piste extraits de 12 tissus différents, est hybridée avec un fragment d'ADNc spécifique de hp76 de 307 pb (nt 1323-1630 de la séquence codante). L'ADN codant pour la  $\beta$ -actine humaine est utilisé comme contrôle positif et standard interne. Le marquage radioactif de ces sondes est réalisé avec du [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP par synthèse d'ADN avec amorces aléatoires (Rediprime II Random Prime, GE Healthcare). Les différentes étapes subies par la membrane sont les suivantes : pré-hybridation à 65°C pendant 30 min avec la solution ExpressHyb (Clontech), hybridation avec la sonde radioactive à 65°C sur la nuit, lavages de 15 minutes à température ambiante, une fois avec du SSC 2 X, 0,1% (p/v) SDS, deux fois avec du SSC 1 X, 0,1% SDS et deux fois avec du SSC 0,5 X, 0,1% SDS. Le résultat de l'hybridation est révélé sur un PhosphorImager (BioRad), et quantifié avec le logiciel Quantity One (BioRad). La membrane est déshybridée par 4 bains de 50 mL de SDS 0,5% préalablement bouilli, puis rincée plusieurs fois au SSC 2X (Sambrook et al., 1989).

### 3. Techniques d'interférence à ARN

Les séquences des duplexes de siRNA qui ciblent l'ARNm de hp76 sont indiquées dans le Tableau 5. Elles ont été dessinées par le fabriquant (Proligo). Certains de ces duplexes ont été synthétisés avec une étiquette biotine placée à l'extrémité 5' du brin sens.

**Tableau 5. Duplexes de siRNA ciblant l'ARNm de hp76. La numérotation des nucléotides (nt) commence au premier nucléotide (nt) du cadre ouvert de lecture de hp76.**

Nom du duplexe	séquence ciblée sur l'ARNm de hp76 et particularités	brin sens	brin antisens
siRNA1	nt 310-329	GCACAAGUGGCCAAUAC AAdTdT	UUGUAUUGGCCACUUG UGCdTdT
siRNA2	nt 404-422	UGAACACGGTUGGTUGA AUUAdTdT	UAAUUCACCACCGUGUU CAdTdT
siRNA1-biotine	siRNA1 avec une biotine greffée en 5' du brin sens	biotGCACAAGUGGCCAA UACAAdTdT	UUGUAUUGGCCACUUG UGCdTdT
siRNA C-	contrôle négatif (séquence aléatoire du siRNA1), avec une biotine greffée en 5' du brin sens	biotACAUGGCUAACGAA CACGAdTdT	UCGUGUUCGUUAGCCAU GUdTdT

Quatre plasmides codant pour des shRNA ciblant spécifiquement hp76 ont été achetés (Sigma). Le Tableau 6 donne la séquence des shRNA produits par ces plasmides, et la séquence ciblée sur l'ARNm de hp76.

**Tableau 6. ShRNA ciblant l'ARNm de hp76. La numérotation des nucléotides (nt) commence à au premier nt du cadre ouvert de lecture de hp76.**

Nom du duplexe	séquence ciblée sur l'ARNm de hp76 et particularités	séquence du shRNA
shRNA1	nt 1430-1450	CCGGGCTGATGAGGTACAATGACTTCTC GAGAAGTCATTGTACCTCATCAGCTTTTT
shRNA2	nt 810-830	CCGGGCTGCGTGTTCATCAAGAAGTACTC GAGTACTTCTTGATGACACGCAGCTTTTT
shRNA3	nt 498-518	CCGGGCAGGAAGAGATGGAGTCAAACT CGAGTTTGACTCCATCTCTTCTGCTTTT T
shRNA4	nt 2303-2323 (3' non codant)	CCGGCCTTGAGGACAGAACTTGAAGTC GAGTTCAAGTTTCTGTCCTCAAGGTTTTT

## **II . BIOLOGIE CELLULAIRE**

### **1. Lignées cellulaires**

Les lignées cellulaires HeLa et U937 proviennent de l'ATTC (American Type Culture Collection) et la lignée HEK 293-EBNA a été achetée à Invitrogen. Les fibroblastes murins JR11 nous ont été donnés par le Dr B. Hoflack (Université de Dresden, Allemagne). Les cellules de cette lignée sont des fibroblastes embryonnaires de souris dont les gènes codants pour les deux récepteurs au mannose-6-phosphate (CI-MPR et CD-MPR) ont été inactivés. Du fait de cette déficience, les cellules sécrètent constitutivement les protéines M6P nouvellement synthétisées. Les fibroblastes humains « ICD » (I-Cell Disease) nous ont été donnés par le Pr T. Levade (Inserm U466, Toulouse, France). Ces cellules sont des fibroblastes isolés d'une personne atteinte de mucopolysaccharidose de type II et immortalisés. Cette maladie est due à une déficience en l'UDP-GlcNAc phosphotransférase, ce qui provoque une sécrétion constitutive des protéines lysosomales solubles et une quasi-absence des hydrolases acides dans les lysosomes.

Les lignées HeLa, HEK 293-EBNA, JR11 et ICD sont cultivées en DMEM-GlutamaxI riche en glucose (4,5 g/L)/10 % SVF. La lignée U937 est cultivée en RPMI-GlutamaxI/10% de SVF. Les lignées CHO sont cultivées en  $\alpha$ -MEM/10% SVF. Les milieux et le sérum sont vendus par Invitrogen.

### **2. Transfection et lignées cellulaires transfectées**

Les cellules HeLa et CHO sont transfectées à l'aide de Fugène6 (Roche), selon le protocole fourni, tandis que la transfection des cellules HEK 293-EBNA est réalisée par précipitation au phosphate de calcium. La sélection des lignées transfectées de manière stable est réalisée par addition dans le milieu de culture de généticine (G418 sulfate, Invitrogen) à 0,6 mg/mL (HeLa) ou à 1 mg/mL (CHO) ou à 0,3 mg/mL d'hygromycine B (Invitrogen) (HEK 293-EBNA). Les lignées CHO après transfection sont maintenues en présence de 0,6 mg/mL de généticine.

La transfection des duplexes de siRNA (160 nM final) sur les cellules CHO/hp76-GFP est réalisée avec de la Lipofectamine 2000 (Invitrogen) selon les recommandations du fabricant. La transfection des duplexes de siRNA (mélange 9/1 ou 8/2 de duplexes non marqués et de duplexes marqués à la biotine, 100 nM final) sur les cellules HeLa est réalisée avec

l'oligofectamine (Invitrogen), selon les recommandations du fabricant. La transfection des lignées 293/hp76-myc avec les plasmides de shRNA est réalisée par précipitation au phosphate de calcium, puis les cellules sont sélectionnées en ajoutant de la puromycine dans le milieu de culture (3 µg/mL, Invitrogen)

### **3. Analyses en immunofluorescence**

Pour des analyses en transfection transitoire, les cellules HeLa sont transfectées à 70 % de confluence, puis étalées sur des petites lames à 8 puits (BD Falcon) à 10<sup>4</sup> cellules /puits le jour suivant. Dans le cas des lignées stables, les cellules sont étalées directement, à la même concentration. Trois jours après, les cellules sont lavées avec du PBS et fixées durant 20 min à température ambiante dans du méthanol/acétone (50/50) pré-refroidi à -20°C. Avant chaque incubation avec un anticorps, pour éviter le marquage non-spécifique, les cellules sont incubées 5 à 10 minutes avec la solution de blocage (PBS, Tween-20 0,1 %, BSA 2 %). Les anticorps primaires sont dilués dans la solution de blocage et laissés 45 minutes à 37°C (Tableau 7 pour les dilutions). Les cellules sont ensuite lavées trois fois 5 minutes avec du PBS et incubées à 37°C pendant 30 minutes avec les anticorps secondaires (Tableau 7 pour les dilutions). Les anticorps sont toujours incubés séquentiellement. Après deux lavages au PBS, les noyaux sont colorés par du Hoechst à 2 µg/mL (Molecular Probes). Parfois, les marquages sont post-fixés par une incubation de 15 minutes à température ambiante avec une solution de PFA 4% dans du PBS. Les cellules sont lavées une fois avec du PBS, une fois à l'eau ultrapure et couvertes d'une lamelle, en présence de Mowiol (Calbiochem). La fluorescence est observée avec un microscope confocal TSC-SP2 (Leica). Les émissions de fluorescence de l'Alexa 488 et du FITC sont collectées entre 500 et 530 nm (longueur d'onde d'excitation : 488 nm), celle de la Cy-3 entre 555 et 620 nm (longueur d'onde d'excitation : 543 nm) et celle de la Cy-5 entre 660 et 680 nm (longueur d'onde d'excitation : 633 nm). Les paramètres sont toujours acquis séquentiellement.

**Tableau 7. Informations sur les anticorps primaires et secondaires utilisés en immunofluorescence.**

Sérum/anticorps	Espèce	Espèce cible	fluorochrome	fournisseur	dilution
hp76Ab	lapin	homme	-	Charles River Laboratories	Purifié : 1/50
EST-13Ab	lapin	homme	-	Charles River Laboratories	1/35
Crp76Ab	lapin	rat, souris, homme	-	Charles River Laboratories	1/40
Irp76Ab	lapin	rat, souris	-	Charles River Laboratories	1/20
Nhp76Ab	lapin	homme	-	Neo MPS	purifié : 1 /25 (pas de marquage)
Nmp76Ab	lapin	souris	-	Neo MPS	purifié : 1 /20 (pas de marquage)
Anti-LAMP1	souris	homme	-	BD PharMingen	1/1000
Anti LAMP2	souris	homme	-	BD PharMingen	1/1000
Anti-cathepsine D humaine, murine	chèvre	souris, homme	-	Santa Cruz	1/25
$\alpha$ -lapin Cy-3	chèvre	lapin	Cy-3	Jackson	1/1000
$\alpha$ -lapin A488	chèvre	lapin	Alexa 488	Molecular Probes	1/1000
$\alpha$ -souris Cy-3	âne	souris	Cy-3	Jackson	1/1000
$\alpha$ -souris A488	chèvre	souris	Alexa 488	Molecular Probes	1/1000
$\alpha$ -souris Cy-5	âne	souris	Cy-5	Jackson	1/1000
$\alpha$ -chèvre Cy-3	âne	chèvre	Cy-3	Jackson	1/200
$\alpha$ -chèvre FITC	âne	chèvre	FITC	Serotec	1/200

#### 4. Internalisation de hp76-myc par les cellules ICD

Des cellules ICD sont étalées à environ  $6 \times 10^4$  cellules / mL. Le lendemain, les cellules sont lavées une fois avec du PBS. Une solution de hp76-myc en PBS, purifié à partir de surnageant de culture de cellules 293/hp76-myc sur une colonne IMAC d'ion cobalt (cf paragraphe « Purification de hp76-myc sur la colonne IMAC d'ion cobalt ») et concentré 1200 fois par rapport au surnageant initial, est mélangée à un volume de milieu DMEM, SVF 10%. Après plusieurs heures d'incubation, les cellules sont lavées trois fois avec du PBS, fixées par un mélange méthanol/acétone et immunomarquées comme indiqué au paragraphe « Analyses en immunofluorescence ».

### **III . BIOCHIMIE**

#### **1. Electrophorèse et coloration des gels**

La séparation par SDS-PAGE des protéines réduites est réalisée selon le protocole de Laemmli (Laemmli, 1970), en utilisant des systèmes BioRad ou Xcell SureLock Novex, Invitrogen) avec des gels pré-coulés commerciaux (NuPage, Invitrogen). Les gels en 2 dimensions sont réalisés selon le protocole décrit dans (Journet et al., 2000; Journet et al., 2002). Des bandes d'isoélectrofocalisation IPG de 7 cm (gradient linéaire de pH 4-8) sont utilisées pour la 1<sup>ière</sup> dimension, et la 2<sup>ième</sup> dimension est réalisée sur des mini-gels (9x9cm) SDS-PAGE à 10% de polyacrylamide. Les gels sont colorés au nitrate d'argent ou au bleu colloïdal (Bio-Safe, BioRad).

#### **2. Western blot et overlay**

Les échantillons de protéines séparés par SDS-PAGE sont transférés sur une membrane de PVDF Immobilon-P (Millipore), à 90V, pendant 1h30, à 4°C en Tris-Base 25 mM, glycine 192 mM, éthanol 10%. Après transfert, les membranes sont bloquées avec du lait écrémé 5 à 10 % (p/v), dans un tampon PBS/Tween-20 0,05% (v/v), pendant 10 à 30 minutes à température ambiante. Elles sont ensuite incubées avec l'anticorps primaire dilué dans du lait écrémé à 2 %, soit sur la nuit à 4°C, soit 1h30 à température ambiante. Les dilutions employées sont indiquées dans le Tableau 8. Les membranes sont ensuite lavées trois fois 5 minutes avec du PBS/Tween-20 0,05% et incubées 1 heure à température ambiante avec les anticorps secondaires adéquats couplés à la peroxidase de raifort (HorseRadish peroxidase, HRP). Il s'agit soit d'anticorps de chèvre anti-lapin-HRP (Pierce) aux dilutions 1/50000 ou 1/25000, soit d'un anticorps de chèvre anti-souris-HRP (BioRad) à la dilution 1/3000, ou d'un anticorps de souris anti-chèvre-HRP (Sigma) à 1/1000. Le signal est détecté par chimioluminescence, avec le substrat SuperSignal WestPico (Pierce) puis révélation sur film photographique (Kodak).

**Tableau 8. Informations sur les anticorps primaires utilisés Western blot**

Sérum/anticorps	Espèce	Espèce cible	référence et fournisseur	Dilution en Western blot
hp76Ab	Lapin	homme	Charles River Laboratories	1/1000 Purifié : 1/1000
EST-13Ab	Lapin	homme	Charles River Laboratories	1/1000
Crp76Ab	Lapin	rat, souris, homme	Charles River Laboratories	1/1000 à 1/800
Irp76Ab	Lapin	rat, souris		1/400
Nhp76Ab	Lapin	homme	Neo MPS	1/ 500 Purifié : 1/500
Nmp76Ab	Lapin	souris	Neo MPS	1/ 500 Purifié : 1/500
ATPase mitochondriale (sous-unité F0)	Lapin	souris	don de Dr Dupuis et Dr Lunardi	1/ 3000
LAMP1	rat	souris	1D4B, DSHB	1/500
CD-98	chèvre	souris	M-20, Santa Cruz	1/200

L'expérience d'overlay est réalisée d'après le protocole de Valenzano et al. (Valenzano et al., 1993). Des protéines M6P purifiées à partir de cellules U937 sont séparées par électrophorèse 2D sur mini-gels et transférées sur membrane de nitrocellulose (BioRad). Les membranes sont bloquées dans du TBS, Tween-20 0,1%, BSA 3% (p/v) pendant 1 heure à température ambiante, puis incubée avec du sCI-MPR purifié au laboratoire, biotinylé (Biotin Protein Labelling kit, Roche) à 3,3 nM dans du TBS/0,1 % Tween-20/1% BSA, avec ou sans 5mM M6P (Sigma-Aldrich). La membrane est ensuite incubée avec de la neutravidine-HRP (1/75000, Pierce) dans du TBS, 0,1 % Tween-20, 1 % BSA. La détection du signal se fait de manière identique aux Western blots.

### 3. Déshybridation des membranes de Western blot

Les membranes ayant déjà été incubées avec des anticorps primaire et secondaire peuvent être ré-incubées avec un autre anticorps après avoir été déshybridées. Pour cela, la membrane est incubée dans du tampon Tris/glycine/SDS (Tris-Base 25 mM, glycine 192 mM, 0,1% (w/v) SDS, Biorad) à 50°C pendant 30 minutes, sous agitation. La membrane est ensuite lavée de manière extensive avec du PBS/Tween-20 0,1%. L'absence de signal résiduel sur la membrane est systématiquement contrôlée par blocage en PBS, Tween-20 0,05%, lait 5-10 %, incubation avec l'anticorps secondaire et révélation en chimioluminescence.

#### **4. Purification des anticorps**

La purification de hp76Ab est réalisée par affinité sur une colonne de hp76-myc immobilisée (cf paragraphe 16. « Préparation d'une colonne d'affinité hp76-myc »). Les anticorps spécifiques sont élués par 400 µL de glycine 100 mM, NaCl 150 mM à pH 2,3, et immédiatement neutralisés par l'ajout de 40 µL de Tris 1M, pH 9,6. L'éluat est ensuite concentré à 250 µg/mL final (la concentration est déterminée par la mesure de l'absorbance à 280 nm, où 1 unité DO<sub>280nm</sub> correspond approximativement à 0,7 mg/mL d'IgG). Le tampon est changé par ultrafiltration pour du PBS, puis les anticorps sont conservés à -20°C dans 50 % PBS, 50% glycérol, 0,05% d'azide de sodium.

Pour purifier Nmp76Ab, Irp76Ab ou Crp76Ab, les sera sont purifiés sur le peptide antigénique correspondant fixé sur une membrane de PVDF de 8 cm<sup>2</sup> (Immobilon P, Millipore). La membrane est mouillée avec du méthanol, rincée avec 20% de méthanol dans du PBS, et incubée avec les peptides à 200 µg/mL dans 20% de méthanol dans du PBS (1,5 mL) durant 5 heures, à température ambiante. La membrane est ensuite lavée trois fois 5 min avec du PBS, trois fois 5 min par du tampon glycine 20 mM, NaCl 150 mM, pH 2,3 et une fois 5 min par du PBS. La membrane est ensuite incubée avec le sérum (1 mL) sur la nuit, à 4°C, puis elle est lavée trois fois 5 minutes avec du PBS. Les anticorps sont élués par deux fois 750 µL de tampon glycine 100 mM, NaCl 150 mM, pH 2,3. Les anticorps purifiés sont neutralisés, concentrés et conservés comme l'anticorps hp76Ab.

#### **5. Fat blots**

Nous avons utilisé une membrane commerciale (P-6002, Echelon) qui est une membrane de nitrocellulose sur laquelle sont déposés des triglycérides, du diacylglycérol, de l'acide phosphatidique (PA), de la phosphatidyléthanolamine (PE), de la phosphatidylsérine (PS), du phosphatidylglycérol (PG), du phosphatidylinositol 4-monophosphate (PI4P), du phosphatidylinositol 4, 5-diphosphate (PI 4,5P2), du phosphatidylinositol 3, 4, 5-triphosphate (PI 3,4,5P3) (synthétiques, di-C16 :0), de la cardiolipine (synthétique, di-C14 :0), du phosphatidylinositol (PI, de soja, C18 :2 et C16 :0), du cholestérol (de laine de mouton), de la sphingomyéline (synthétique) et du sulfatide (de cerveau de porc).

Des membranes portant des lipides sont réalisées au laboratoire par dépôt de phospholipides ou d'acides gras solubilisés dans du chloroforme ou de l'éthanol, sur des membranes de nitrocellulose (Hybond C extra, GE Healthcare).



## **6. Détermination de la séquence N-terminale des protéines**

Pour la détermination de leur séquence N-terminale, les protéines sont séparées par SDS-PAGE 12%, transférées sur une membrane ProBlott (Applied Biosystem) pendant 3 heures à 60V, dans 10 mM de CAPS-NaOH pH 11.0, 10% méthanol. La membrane est colorée pendant 1 minute par du bleu de Coomassie Brilliant Blue R-250 (Pierce) 0,1% (p/v), dans du méthanol 40%/ acide acétique 0,5%, et décolorée par de l'éthanol 30%. La détermination de la séquence en acides aminés basée sur la dégradation d'Edman est réalisée par le Laboratoire d'Enzymologie Moléculaire (IBS, Grenoble) avec un séquenceur phase gaz (modèle 492, Applied BioSystem). Les dérivés d'acides aminés-phénylthiohydantoïnes générés à chaque cycle de séquençage sont identifiés et quantifiés en ligne avec un système HPLC (Modèle 140C, Applied Biosystem) doté de son logiciel d'analyse de données (Modèle 610A, version 2.1).

## **7. Analyse des N-glycosylations**

Des protéines M6P purifiées à partir de cellules U937 sont dialysées contre du tampon phosphate de sodium 100 mM, pH 7,4, EDTA 20 mM et bouillies pendant 10 minutes dans le même tampon contenant 1% de SDS. Les échantillons sont ensuite dilués 10 fois dans du tampon de réaction (tampon de phosphate de sodium 100 mM, pH 7,4, EDTA 20 mM, 1% NP-40, 1 % (v/v)  $\beta$ -mercaptoéthanol, 0,1% SDS) et la PNGase F est ajoutée à une concentration finale de 60 U/mL. Les échantillons sont laissés à 37°C pendant les durées indiquées. La réaction est stoppée par l'ajout de tampon Laemmli ou en bouillant les échantillons pendant 10 minutes. Dans ce dernier cas, les fragments déglycosylés sont concentrés en utilisant 10  $\mu$ L de billes Strataclean (Stratagen) par échantillon en vortexant pendant 1 minute et en centrifugeant les billes. Les protéines sont éluées en bouillant les billes reprises dans du tampon Laemmli pendant 10 min. Pour l'analyse en Western blot, on dépose sur chaque piste l'équivalent de  $6 \times 10^6$  cellules U937 pour l'analyse avec hp76Ab et de  $30 \times 10^6$  cellules pour l'analyse avec Crp76Ab et Nhp76Ab.

## **8. Production et purification de protéines M6P à partir de lignées cellulaires**

Les protéines M6P sont produites et purifiées selon les protocoles décrits dans la littérature (Hoflack et al., 1987; Journet et al., 2000; Journet et al., 2002). Pour la lignée U937, les cellules sont lavées avec du PBS, diluées à  $10^6$  cellules/mL un milieu DMEM-GlutamaxI/RPMI-GlutamaxI 1/1 supplémenté avec 1 % (v/v) de Nutridoma-SP (Roche), 10

mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  et incubée durant 24h. Pour les cellules JR11, les cellules à confluence sont lavées avec du PBS et placées dans le même milieu mais sans  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . Les protéines M6P des cellules 293/hp76-myc sont purifiées à partir des surnageants en DMEM-GlutamaxI. Les protéines des surnageants sont ensuite précipitées au sulfate d'ammonium (0,5 g/mL) ou concentrées par ultracentrifugation sur des colonnes Microcon YM-10 ou Centricon YM-10 (Millipore). La purification par affinité est réalisée soit sur une colonne Affigel-10, soit sur une colonne Vivapure Mini (Epoxy membrane mini H, Vivascience) soit sur des filtres Sartobind Epoxy 75 (Sartorius) sur lesquelles du sCI-MPRa été greffé. Les protocoles de purification sont adaptés selon les recommandations du fournisseur. Les protéines liées au sCI-MPR sont éluées par 20 mM de M6P dans le tampon d'équilibration.

### **9. Production et purification de protéines M6P à partir de cerveau de souris**

Quatre cerveaux de souris C57 Black 6 (1,7g) sont homogénéisés dans 10 volumes (v/p) de tampon d'homogénéisation (tampon phosphate de sodium 20 mM, pH 6,8, NaCl 150 mM,  $\beta$ -glycerophosphate 5 mM, EDTA 2,5 mM), contenant 1 % (v/v) de Triton X-100 et des inhibiteurs de protéases (Complete, Roche), en utilisant un potter en téflon couplé à un rotor électronique (RZR 2102 control, Heidolph). Les protéines M6P de cerveau de souris sont purifiées par affinité sur la colonne de sCI-MPR (Vivapure Epoxy membrane mini H, Vivascience), comme décrit pour les protéines M6P de lignées cellulaires (cf ci-dessus), sauf que les protéines retenues sur la colonne sont lavées trois fois avec du Triton X-100 1 % dans du tampon d'homogénéisation et trois fois avec du tampon d'homogénéisation seul. Les protéines liées au sCI-MPR sont éluées par du M6P 20 mM dans le tampon d'équilibration.

### **10. Production et purification de protéine recombinante FLAG-hp76**

Des bactéries *E. coli* souche BL21, transformées avec le plasmide pFLAG-hp76 (nommées E.coli/FLAG-hp76) sont cultivées dans un milieu Luria-Bertani à 37°C jusqu'à atteindre une densité optique de 0,6 unités (absorbance à 600 nm). L'expression est induite par 1 mM d'IPTG. Quatre heures après induction, les cellules sont récoltées par centrifugation à 7000g pendant 10 minutes à 4°C. Le culot des cellules est d'abord soumis à un choc osmotique, pour libérer les protéines du périplasme dans le surnageant. Les fractions solubles et les corps d'inclusion sont préparés en suivant le protocole du réactif utilisé pour extraire les protéines de *E. coli* (Bugbuster, Novagen). Pour la purification des corps d'inclusion, le culot bactérien est lavé par 10 % du volume de culture avec le tampon 1 (Tris-HCl 50 mM pH 8,0, NaCl 100

mM, EDTA 10 mM). Du lysozyme est ajouté à une concentration finale de 1 g/L. Après centrifugation à 5000g pendant 25 minutes à 4°C, les culots sont congelés dans de l'azote liquide et stockés à -20°C. Pour purifier les corps d'inclusion, qui contiennent la plus grande partie de hp76 recombinante, le culot est lavé trois fois avec du déoxycholate de sodium 0,1 % (p/v) dans le tampon 1, 5 fois avec du NP-40 1 % (v/v) dans le tampon 1 et une fois avec de l'urée 1 M, Tris-HCl 50 mM pH 8,0. Finalement, les corps d'inclusion sont dissous dans de l'urée 8 M, Tris-HCl 50 mM pH 8,0, et sont dialysés de manière extensive contre du PBS, ce qui provoque leur précipitation. Ils sont alors centrifugés à 10000g pendant 10 minutes à 4°C puis lyophilisés.

### **11. Production de protéine recombinante hp76-myc issue des cellules CHO/hp76-myc**

Pour la production de la protéine recombinante dans le surnageant, les CHO/hp76-myc (ou CHO/mock) sont lavées deux fois avec du PBS et mises en milieu  $\alpha$ -MEM, Nutridoma 1% (substitut de sérum, Roche). Le surnageant est collecté et changé trois fois par semaine, pendant un mois. Il est centrifugé une première fois à 300g 5 minutes pour faire tomber les cellule mortes, puis il est centrifugé à 10000g au moins 30 minutes à 4°C pour faire tomber les débris cellulaires.

### **12. Production de protéine recombinante hp76-myc issue des cellules 293/hp76-myc**

Les cellules des lignées stables 293/hp76-myc confluentes sont lavées deux fois avec du PBS et mises en milieu DMEM-Glutamax seul. Le surnageant est collecté et changé deux fois par semaine, pendant un mois. Le surnageant est centrifugé une première fois à 300g 5 minutes pour faire tomber les cellule mortes, puis il est centrifugé à 10000g 30 minutes à 4°C pour faire tomber les débris cellulaires.

### **13. Précipitation au sulfate d'ammonium**

Le sulfate d'ammonium (75 % de saturation soit 0,5 g/mL) est ajouté progressivement au surnageant de culture à 4°C sous agitation et la précipitation des protéines se fait sur la nuit. Ensuite, le surnageant est centrifugé 1h, à 4°C, à 10000g.

### **14. Concentration des surnageants de culture, changement de tampon**

Dans le cas de la concentration par ultrafiltration, le surnageant collecté est concentré successivement sur un Centricon Plus-20 (Biomax-5, Millipore) (pour réduire le volume à 2

mL), puis sur une colonne Vivaspin 500 (cut-off de 5kDa, Vivascience) pour atteindre des volumes de l'ordre de 40  $\mu$ L. Les mêmes systèmes sont employés pour changer le tampon d'un échantillon.

### **15. Purification de hp76-myc sur la colonne IMAC d'ion cobalt**

La purification de hp76-myc est réalisée sur une colonne IMAC d'ion cobalt, qui retient l'étiquette His<sub>6</sub>. Cette colonne est préparée au laboratoire à partir d'un filtre maxi-Vivapure ayant une membrane de type IMAC (pour Immobilized Metal Affinity Chromatography), selon les recommandations du fabricant (Vivascience). Brièvement, une solution de cobalt 0,5 M est passée sur le filtre, puis celui-ci est lavé avec du NaCl 0,1M et équilibré avec le tampon d'équilibration (imidazole 10 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, NaCl 300 mM). Le surnageant de culture de cellules 293/hp76-myc précipité au sulfate d'ammonium est préalablement dialysé contre le tampon d'équilibration (15 mL) dans des boudins de dialyse avec 4 bains de 100 fois le volume d'échantillon volume, à 4°C. Après clarification pour enlever des composés insolubles, l'échantillon est passé deux fois sur la colonne IMAC d'ion cobalt. Après 4 lavages avec du tampon imidazole 20 mM, les protéines retenues sur la colonne sont éluées avec du tampon imidazole 500 mM. L'éluat est ensuite concentré par ultrafiltration sur des filtres Ultrafree-4 (Biomax-5, Millipore) et le tampon est changé soit contre du PBS, soit contre du Tris 50 mM. L'éluat en PBS est aliquoté et congelé. L'éluat en Tris est conservé à -20°C avec 50% de glycérol (25 mM Tris final). La concentration en hp76-myc (précurseur de 80 kDa) dans ces deux préparations est estimée à 150  $\mu$ g/mL (par coloration à l'argent et comparaison à une gamme de BSA).

### **16. Préparation d'une colonne d'affinité hp76-myc**

A l'occasion de la mise au point de techniques de purification de hp76-myc, plusieurs types de colonnes ont été testées : colonnes IMAC d'ions nickel, cobalt ou cuivre immobilisés, ou colonnes échangeuses d'ion, réalisées de manière similaire à ce qui a été décrit précédemment. Les espèces protéiques éluées de ces colonnes (principalement hp76-myc) sont mélangées et greffées sur une colonne Vivapure Mini (Epoxy membrane mini H, Vivascience), pour faire une colonne d'affinité hp76-myc, utilisée pour purifier le sérum hp76Ab.

## **17. Fractionnements subcellulaires de lignées cellulaires**

Ce fractionnement simple avait pour but l'obtention d'une fraction soluble (FS) de cellules enrichies en hp76-myc intracellulaire. Les cellules sont trypsinées, lavées 2 fois avec du PBS et centrifugées à 300g. Les culots de cellules sont ensuite repris dans du saccharose 250 mM, Hepes 10 mM, EDTA 1 mM à  $3-5 \times 10^7$  cellules/mL. Les membranes plasmiques sont cassées par deux passages dans une cellule « one shot » d'un appareil « Cell Disrupter » (Basic Z model, Constant Systems LTD) à 0,35 kbar, à froid. Un surnageant post-nucléaire (SPN) est obtenu par centrifugation de cette suspension à 2000g pendant 5 minutes à 4°C. Le SPN est ensuite soniqué avec une sonde à sonication dans la glace (4 fois 10 secondes, à 4 watts environ, par volume de 1 mL) pour casser les organites et libérer leur contenu soluble. L'ultracentrifugation de cette suspension à 120000g, pendant 1 heure à 4°C permet l'obtention d'une fraction soluble FS. On dose la concentration en protéine de la FS par un dosage à l'acide bicinchoninique (kit Sigma), et on obtient en général des concentrations de l'ordre de 2-4 g/L. Les FS sont soit utilisées extemporanément, soit conservées dans du glycérol 50%, à -20°C (cf paragraphe « tests avec le NBD PC »).

Les cellules CHO/hp76-myc ou CHO/mock sont traitées suivant le même protocole, excepté qu'après avoir été trypsinées, les cellules sont reprises en PBS avant leur passage dans le « Cell Disrupter ». Pour casser les organites, le SPN a été congelé, et non soniqué.

## **18. Fractionnements subcellulaires de foies de souris**

Le fractionnement subcellulaire total de foie de souris est réalisé par des centrifugations différentielles selon les protocoles décrits par de Duve et al. (de Duve et al., 1955). Des foies de souris NMRI (pesant 20g environ) à jeûn depuis 12h sont homogénéisés dans du saccharose 0,25 M et soumis à une succession de centrifugations de vitesses et durées croissantes, pour sédimenter les particules en fonction de leur taille. A l'issue de ce fractionnement, l'homogénat de foie est fractionné en fractions nucléaire (N), mitochondriale lourde (M), mitochondriale légère et lysosomale (L), peroxisomale et microsomale (P) et cytoplasmique (S). Pour l'analyse en Western blot, une même quantité de protéines est déposée sur gel, ce qui rend compte de l'enrichissement d'une protéine donnée dans chaque fraction.

Pour séparer les organites en fonction de leur densité, une fraction « ML » est soumise à une centrifugation isopycnique. La fraction ML est préparée par centrifugation différentielle de manière similaire à un fractionnement total, sauf que les fractions M et L sont obtenues

directement ensemble, en centrifugeant le surnageant post-nucléaire à la vitesse de sédimentation la plus élevée, à savoir celle qui permet l'obtention de la fraction L. Pour la centrifugation isopycnique, la fraction ML est déposée au sommet d'un gradient linéaire de saccharose préformé (1,09 – 1,26 g/mL, soit 12,7 – 14,7 M) et centrifugé à 4°C pendant 150 minutes à 144200 g dans un rotor SW 55.Ti Beckman. A l'issue de cette séparation, 13 fractions sont collectées (Beaufay et al., 1964). Les densités sont mesurées à l'aide d'un réfractomètre optique.

Le cas échéant, les souris ont subi une injection de Triton WR-1339 (0,85 mg/g de masse corporelle, tyloxapol, Sigma-Aldrich), 4 jours avant d'être sacrifiées.

## **19. Expériences de choc osmotique**

Une fraction ML (préparée comme pour une centrifugation isopycnique) est soumise à des chocs osmotiques de force croissante, de manière à détruire l'intégrité des organites, et libérer leur contenu soluble (Appelmans and De Duve, 1955). La fraction ML est diluée dans des solutions de saccharose de moins en moins concentrées (telles que la concentration finale est de 0,25 M, 0,20 M, 0,15 M, 0,10 M, 0,05 M ou 0,025 M). Après 15 min d'incubation à 4°C, différents échantillons sont centrifugés à 4°C, à 83700 g pendant 18 min dans un rotor TLA 100.3 Beckman, pour séparer les membranes du contenu soluble. Les membranes sont reprises dans un volume égal à celui du surnageant, dans du saccharose 0,125M, 0,5% Triton X-100. Pour l'analyse en Western blot, 10 µL de chaque échantillon sont prélevés, dilués dans du tampon Laemmli et la concentration en saccharose est ajustée à 70 mM. Ces échantillons sont séparés par SDS-PAGE (gel à 12% de polyacrylamide).

## **20. Dosages d'activités enzymatiques lysosomales dans les fractionnements subcellulaires de foies de souris**

Les activités de la  $\beta$ -galactosidase,  $\beta$ -hexosaminidase et  $\beta$ -glucuronidase sont mesurées avec les substrats suivants, respectivement : 4-methylumbelliferyl- $\beta$ -D-galactopyranoside, 4-methylumbelliferyl-N-acetyl- $\beta$ -glucosaminide, 4-methylumbelliferyl- $\beta$ -glucuronide (Sigma-Aldrich). Les dosages sont réalisés à 37°C, dans 0,2 mL de tampon acétate 50 mM pH 5,0, 0,05 % Triton X-100 et 1 mM de substrat fluorescent. Les réactions sont stoppées en ajoutant 1 mL de tampon glycine 50 mM, EDTA 5 mM, Triton X-100 0,05 %, pH 10,5. La fluorescence est lue à 460 nm (excitation à 360 nm).

## **IV . SPECTROMETRIE DE MASSE ET BIOINFORMATIQUE**

En premier lieu, les échantillons contenant les protéines d'intérêt sont d'abord séparés par SDS-PAGE. Le gel est ensuite coloré par le bleu de Coomassie. Les bandes à analyser sont ensuite excisées du gel. Les morceaux de gel sont traités comme indiqué dans les paragraphes suivants, selon le type d'analyse souhaité.

### **1. MALDI-TOF**

Pour une analyse par empreinte peptidique massique MALDI-TOF (pour Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation - Time of Flight), les bandes de gel contenant les protéines sont lavées avec 200µL de bicarbonate d'ammonium 25 mM, puis par 200µL de bicarbonate d'ammonium 25 mM, 50 % (v/v) d'acétonitrile. Ce cycle de lavage est répété jusqu'à la décoloration complète des bandes de gel. Un dernier lavage est effectué avec de l'eau ultrapure. Les protéines dans le morceau de gel sont alors digérées par la trypsin (Promega), à 37°C sur la nuit, dans un volume final de 20µL de bicarbonate d'ammonium 25 mM. Pour l'analyse en MALDI-TOF, 0,5 µL de la solution de digestion, qui contient les peptides ayant diffusé hors du gel, est mélangée à 0,5 µL de matrice (acide alpha-cyano-4-hydroxycinnamique saturé dans un mélange acétonitrile 50% (v/v), acide trifluoroacétique 0,1% (v/v). Ce mélange est déposé sur la cible de l'appareil. Le MALDI est réglé en mode réflectron, de sorte que la mesure des rapports masse sur charge ( $m/z$ ) des ions peptidiques soit optimale pour les peptides de masse comprise entre 800 et 3000 Da. L'appareil est calibré avec un mélange de 4 peptides de masse connue.

### **2. LC/MS-MS**

Pour une analyse par LC-MS/MS, les bandes de gel colorée par le bleu de Coomassie sont décolorée par de l'éthanol 30%, puis les protéines dans le gel sont oxydées avec 7% de  $H_2O_2$  et sont clivées en peptides par une digestion à la trypsin. Les peptides sont ensuite extraits en trois étapes : à l'acétonitrile 50 % (v/v), puis à l'acide formique 5 % (v/v) et enfin à l'acétonitrile 100 %. Les peptides sont lyophilisés, resuspendus dans de l'acide trifluoroacétique 0,5% , puis injectés dans un système CapLC nanoLC (Waters) couplé à un spectromètre de masse QTOF Ultima (Waters). Les données de spectrométrie de masse en tandem sont acquises et analysées automatiquement par un logiciel MassLynx 4.0 (Waters). La recherche dans les banques de données est effectuée par le programme Mascot 2.0

([www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com)), disponible sur notre Intranet, avec la dernière compilation de la banque de données NCBI. Pour le paramétrage de l'identification, les modifications variables des cystéines et des méthionines en acides cystéiques et sulfones respectivement, sont autorisées, ainsi que l'oubli d'un site de clivage par la trypsine. Les protéines identifiées avec au moins deux peptides ayant chacun un score supérieur à 40 sont validées sans vérification manuelle. Les peptides ayant un score compris entre 18 et 40 sont vérifiés manuellement pour confirmer ou annuler la suggestion de Mascot.

### **3. Bioinformatique**

Les protéines des gels en 2D sont quantifiées en utilisant le logiciel Melview (BioRad). Les recherches d'homologies de séquences sont réalisées avec le serveur BLAST de NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). Le logiciel « compute Mw/pI tool » du site Internet Expasy ([www.expasy.org/tools/pi\\_tool.html](http://www.expasy.org/tools/pi_tool.html)) est utilisé pour la prédiction des masses moléculaires. Le site Internet du Centre pour L'Analyse des Séquences Biologiques (Centre for Biological Sequence Analysis, [www.cbs.dtu.dk](http://www.cbs.dtu.dk)) a fourni le logiciel de prédiction du peptide signal (SignalP 3.0) et le site de prédiction des sites de N-glycosylation (NetGlyc 1.0). Le site Internet SymAtlas ([www.symatlas.gnf.org](http://www.symatlas.gnf.org)) est consulté pour ses données de transcriptomique centralisées à partir de puces à ARN.



## **V . TESTS ENZYMATIQUES D'HYDROLYSE DE PHOSPHOLIPIDES ET ANALYSE DES PRODUITS DE LA REACTION**

### **1. Tests enzymatiques en milieu liquide avec l'asolectine**

Des « micelles mixtes » sont des micelles préparées avec des phospholipides et un détergent. Dans ce test, des micelles mixtes d'asolectine sont préparées en mélangeant l'asolectine en poudre avec du tampon acétate 250 mM, pH 4,6, Triton X-100 0,1%, de sorte que la concentration finale en asolectine soit de 10 g/L. Cette solution est agitée, vortexée, soniquée dans un bain à sonication. Il se forme assez aisément une suspension stable, c'est-à-dire une solution opalescente et qui ne présente pas de dépôts après une centrifugation brève et à basse vitesse du tube ou après quelques instants sans agitation.

Les liposomes d'asolectine sont fabriqués à partir des micelles mixtes d'asolectine, préparées comme précédemment, sauf que la solution initiale est du NaCl 200 mM, CHAPS 1%. La solution est ensuite dialysée dans des boudins de dialyse dont le seuil de rétention est de 12000 (membrane de cellulose, Sigma-Aldrich). Plusieurs bains sont réalisés (1 h, 4h, sur la nuit, à 4°C) contre 500 fois le volume d'échantillon de tampon réactionnel (tampon acétate 100 mM, pH 5,0, CaCl<sub>2</sub> 2 mM). Le CHAPS est ainsi déplété de la solution d'asolectine, ce qui entraîne la formation de liposomes de phospholipides. Le substrat (150µL) est préchauffé à 37°C, et les échantillons sont ajoutés (des surnageants de culture précipités au sulfate d'ammonium ou des fractions solubles de lysats de cellules CHO/hp76-myc ou CHO/mock). Après 16 heures de réaction à 37°C sous agitation (950 rpm), les lipides sont extraits.

Pour chaque test, un contrôle positif est effectué avec la PLA2 pancréatique porcine (PLA2pp, Sigma) dont le substrat est préparé de manière similaire aux échantillons hp76-myc, sauf que la solution de réaction est du Tris 10 mM, CaCl<sub>2</sub> 2 mM, pH 7,2 (avec Triton X-100 0,1% dans le cas de micelles).

### **2. Tests enzymatiques en milieu liquide avec la cardiolipine**

200µg de cardiolipine de *E. coli* (Sigma-Aldrich) solubilisée en chloroforme sont déposés dans un flacon en verre, évaporée sous N<sub>2</sub> et séchée sur la nuit dans un dessiccateur sous vide. Elle est ensuite préparée sous forme de micelles par l'ajout de 400 µL d'un tampon acétate 25 mM, pH 4,75, NaCl 100mM, CaCl<sub>2</sub> 10mM et CHAPS 0,1% préalablement autoclavé.

### **3. Extraction des lipides**

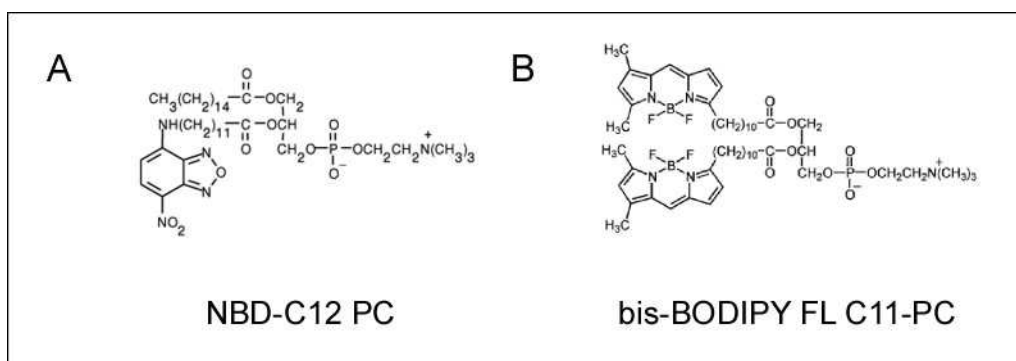
L'extraction des lipides est réalisée d'après le protocole de Bligh et Dyer (Bligh and Dyer, 1959) avec certaines modifications apportées par la littérature. A un échantillon aqueux de 1 mL est ajouté 3,75 mL de chloroforme/méthanol 2 / 1, qui est ensuite vortexé durant 10-15 minutes. Afin d'améliorer l'extraction, 1,25 mL d'eau est rajoutée et le tout est vortexé pendant 1 minute. Parfois, l'eau est remplacée par du KCl 1M, pour améliorer le rendement de l'extraction. La solution est ensuite décantée, soit sur la paillasse, soit en centrifugeant brièvement à basse vitesse. La phase inférieure est celle qui contient les lipides. Elle est récupérée et évaporée sous un flux de N<sub>2</sub>. Les lipides secs sont repris dans un petit volume de chloroforme/méthanol 2/1 avant la migration.

### **4. Migration en chromatographie en couche mince (CCM)**

Généralement, les échantillons sont déposés en double, sur deux plaques de CCM (silica gel F254, 20x20cm, Merck). Les deux plaques sont soumises à une première migration dans une phase apolaire (chloroforme/ether de pétrole/acide acétique, 65 / 35 / 4). L'une des deux plaque subit une deuxième migration dans une phase polaire chloroforme/méthanol/acide acétique, 50 / 50 / 4. La migration jusqu'à quelques centimètres du bord dure approximativement 1h30. Les composés sont révélés en présence de vapeurs d'iode (cristaux de I<sub>2</sub>, Sigma-Aldrich) et éventuellement par une coloration avec une solution de sulfate de cuivre (3 % (p/v) de CuSO<sub>4</sub>, 15% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) vaporisée sur la plaque, qui est ensuite séchée et incubée dans un four à 100-150°C jusqu'à l'apparition de taches brunes (30 min à 1 heure).

### **5. Tests d'activité en milieu liquide avec des substrats fluorescents**

Les substrats vendus dans le commerce pour détecter une activité phospholipase A (A1 ou A2) sont la phosphatidylcholine-NBD (Figure 12A) et la phosphatidylcholine bis-BODIPY (Figure 12B)(respectivement NBD-C12 PC, N-3787 et bis-BODIPY FL C11-PC, B7701, Molecular Probes).



**Figure 12. Structure des substrats fluorescents commerciaux, utilisés pour la détection d'activité phospholipase A1 ou A2.**

## 6. Tests avec le NBD-PC

Une solution stock de NBD-PC à 1 mM est préparée dans l'éthanol absolu. Pour les tests, 15 à 30  $\mu$ L de substrat sont injectés dans 3 mL de tampon acétate 50 mM pH 5,0, CaCl<sub>2</sub> 2mM tel que la concentration finale en NBD-PC est de 5-10  $\mu$ M. L'éthanol se disperse et le NBD-PC forme spontanément des micelles (Campbell, 1995). Cette solution est placée dans une cuve en plastique à 4 faces optiques d'un spectrofluorimètre (F 2000, Hitachi) avec un agitateur magnétique, à température ambiante. Pour les tests, une même quantité de protéines de FS (fraction soluble, cf paragraphe «Fractionnements subcellulaires de lignées cellulaires », généralement 90  $\mu$ g de protéines, dans un volume de l'ordre de 40  $\mu$ L) est ajoutée 30 secondes après le début de l'enregistrement de la fluorescence émise à 540 nm (excitation 460 nm). Les mesures de fluorescence sont réalisées soit sur des temps courts (3 minutes), soit sur des temps longs, auquel cas la cuve est gardée à température ambiante dans le noir, et l'émission de fluorescence est mesurée à intervalles de temps réguliers pendant 2h30, après homogénéisation du milieu réactionnel.

## 7. Tests avec le bis-BODIPY PC

Ce test est réalisé dans les mêmes conditions que celles décrites dans la littérature (Kim et al., 1997). Le substrat est préparé sous forme de liposomes de la manière suivante : le mélange de phospholipides en solvant organique PC / PG / cholestérol / bis-Bodipy PC dans les proportions 10 / 2 / 3 / 0,05 sont mélangés, évaporés sous N<sub>2</sub> et séchés dans un dessiccateur sous vide quelques heures ou la nuit, protégé de la lumière. Les phospholipides secs sont ensuite repris directement dans le tampon réactionnel (tampon acétate 50 mM, EGTA 1mM, pH 4,0) pour être à 0,68 mM final de phospholipides totaux. La suspension est ensuite agitée,

vortexée et souvent soniquée avec une sonde (généralement 3 fois 5 minutes), dans la glace. A 1 mL de ces liposomes incubés à 37°C dans un tube en verre avec un agitateur magnétique est ajouté 350 µL d'échantillon hp76-myc (ou « mock »), purifié de surnageant de culture de cellules 293/hp76-myc (ou 293/mock) sur la colonne IMAC d'ion cobalt et conservé dans du Tris 25 mM, glycérol 50%. La quantité de hp76-myc dans cet échantillon est estimée à 50 µg de hp76-myc. Des aliquots de 250µL sont prélevés à 0, 3h, 8h, et 24h. La réaction est stoppée en ajoutant 2 mL de tampon acétate 50 mM pH 4,0, EGTA 1 mM, puis l'émission de fluorescence est lue par le spectrofluorimètre à 515 nm (longueur d'onde d'excitation, 494 nm).

## VI. OUTILS DEVELOPPES POUR ETUDIER P76

Cette partie est consacrée à la description des outils développés au laboratoire pour caractériser p76 sous ses différentes formes : la forme humaine, nommée hp76, la forme murine, nommée mp76. Il est parfois fait référence à la p76 de rat, rp76.

Ces outils sont des lignées cellulaires permettant la production de p76 sous forme recombinante et des anticorps.

### 1. Lignées cellulaires exprimant p76 recombinante

Les lignées stables portent des noms systématiques, tels que « type cellulaire/hp76-étiquette » (si l'étiquette est située à l'extrémité C-terminale). Les lignées transfectées avec le plasmide vide sont nommées « type cellulaire /mock ». Le Tableau 9 récapitule les lignées utilisées dans le cadre de cette thèse.

**Tableau 9. Récapitulatif des lignées surexprimant hp76-myc ou hp76-GFP**

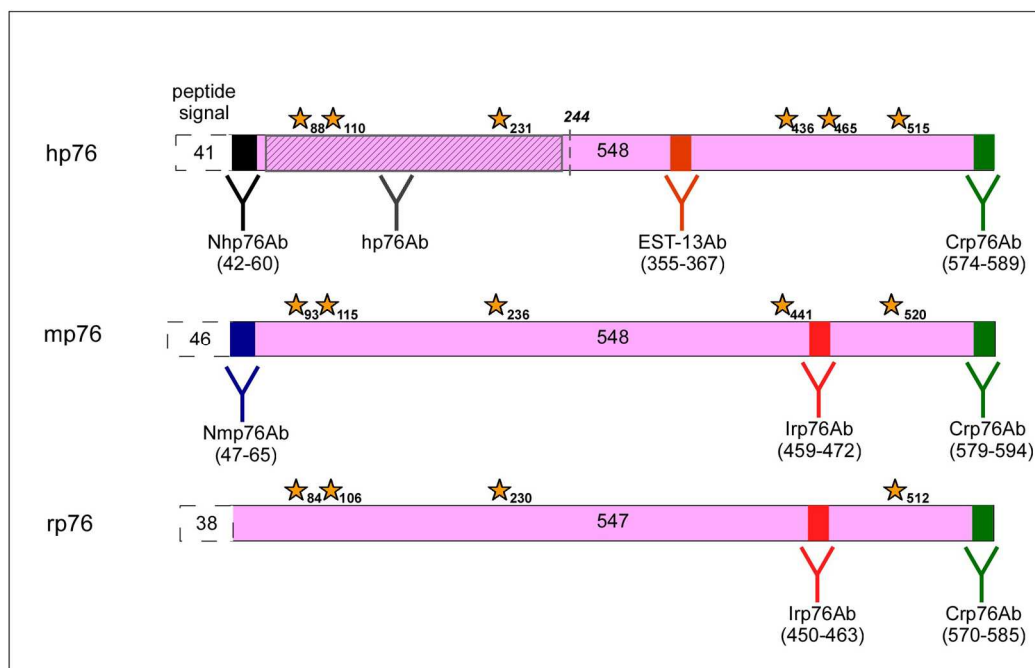
Lignée	Cellules	Etiquette sur hp76 (C-terminale)	Lignée clonale
CHO/hp76-myc	CHO (cobaye)	myc-His <sub>6</sub>	non
CHO/hp76-GFP	CHO (cobaye)	GFP	oui
HeLa/hp76-myc	HeLa (humain)	myc-His <sub>6</sub>	non
HeLa /hp76-GFP	HeLa (humain)	GFP	non
293/hp76-myc	HEK 293-EBNA (humain)	myc-His <sub>6</sub>	oui

Les lignées stables de cellules HeLa expriment de moins en moins la protéine hp76 recombinante au cours du temps. Il semblerait que les cellules parviennent à éliminer le gène étranger de leur génome.

Les plasmides transfectés dans la lignée 293/hp76-myc restent sous forme épisomale, au lieu de s'intégrer dans le génome et sont ainsi stables dans le temps du fait de leur réplication autonome. Le taux d'expression de la protéine exogène est aussi plus important du fait d'un nombre élevé de copies du plasmide par cellule, et les protéines produites sont abondamment sécrétées dans le surnageant.

## 2. Fiches d'identité des anticorps anti-p76

Pour les six anticorps polyclonaux anti-p76 produits, une fiche d'identité a été réalisée, décrivant : la séquence de p76 reconnue par l'anticorps, l'espèce de p76 reconnue, le profil obtenu par Western blot sur divers échantillons contenant p76 (lysats, surnageants de culture, protéines M6P purifiées). La Figure 13 récapitule les caractéristiques de chaque anticorps, le Tableau 10 donne une indication de leur qualité par rapport aux résultats qu'ils donnent.



**Figure 13. Figure récapitulative des anticorps utilisés pour travailler sur les différentes formes de p76.** Les étoiles représentent les sites de N-glycosylation prédits. Les blocs colorés désignent les épitopes reconnus par les anticorps, et leur réactivité croisée. Les nombres désignent la numérotation des résidus selon LOC196463 (hp76), LOC71772 (mp76) et LOC246120 (rp76), complétée.

**Tableau 10. Indice de confiance des anticorps anti-p76, selon leur utilisation.**

Anticorps	Espèces	WB	IF
hp76Ab	hp76	++	++
EST-13Ab	hp76	+ / -	-
Nhp76Ab	hp76	+	-
Crp76Ab	rp76, mp76, hp76	++	++
Irp76Ab	rp76, mp76	+	++
Nmp76Ab	mp76	+ / -	-

Les sera non immun (SNI) ont été testés par Western blot sur des échantillons contenant p76, et ils ne reconnaissent pas (ou très peu) d'espèces (non montré).



## hp76Ab

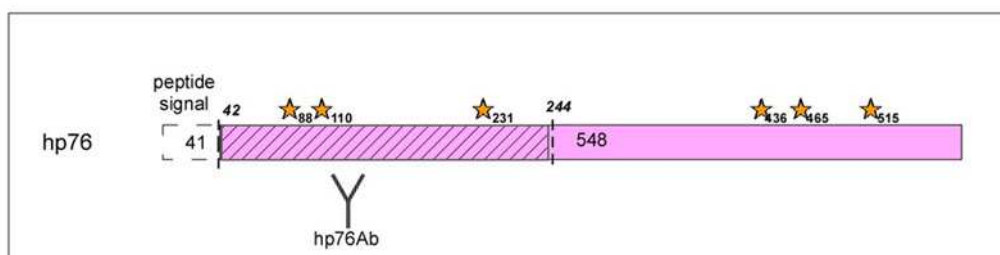


Figure 14. Schéma de la zone de la séquence de hp76 reconnue par l'anticorps hp76Ab (domaine hachuré).

<b>Antigène</b>	corps d'inclusion de FLAG-p76 purifiés
<b>« Epitope » ciblé</b>	Moitié N-terminale de hp76 (entre les résidus 42 et 244 de hp76)
<b>Espèce reconnue</b>	p76 humaine

**Profil observé en Western blot :**

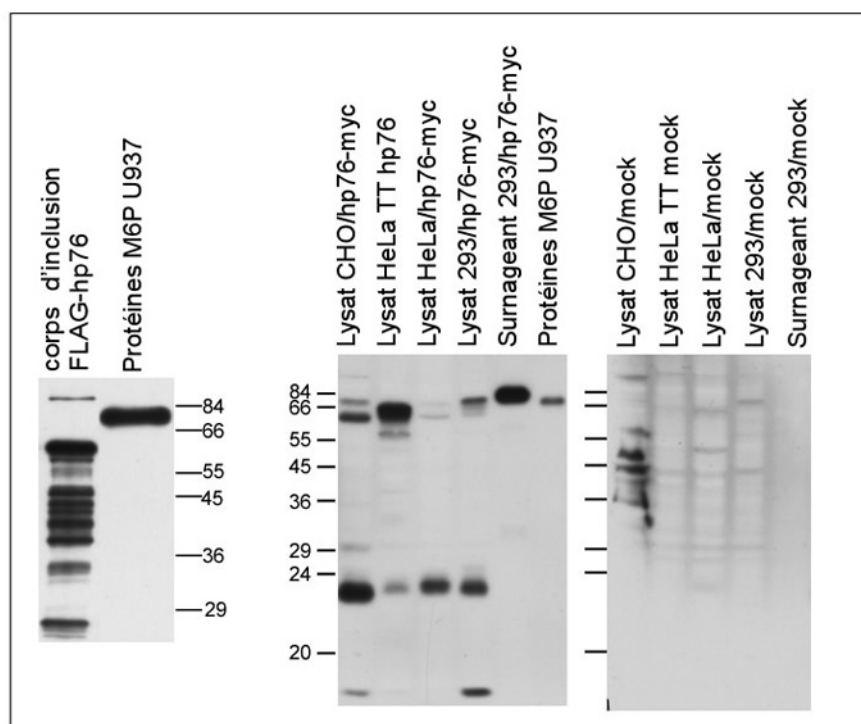


Figure 15. Analyse par Western blot d'échantillons de hp76 avec hp76Ab. Corps d'inclusion purifiés de *E.coli*/FLAG-hp76, protéines M6P purifiées sur sCI-MPR à partir de cellules U937 : équivalent de  $10^7$  cellules. Lysats de CHO/hp76-myc, HeLa/hp76-myc et 293/hp76-myc, et « mock » correspondants :  $2,5 \times 10^5$  cellules. Lysat de HeLa 1 jour après transfection transitoire par le plasmide codant pour hp76 ou le plasmide vide (HeLa TT/hp76 et HeLa TT/mock) :  $10^5$  cellules. Surnageant de culture de cellules 293/hp76 ou 293/mock (SN 293/hp76 ou SN 293/mock) :  $20 \mu\text{L}$ , équivalent de  $10^5$  cellules. Protéines M6P purifiées sur sCI-MPR de cellules U937 : équivalent de  $6 \times 10^6$  cellules.





## EST-13Ab

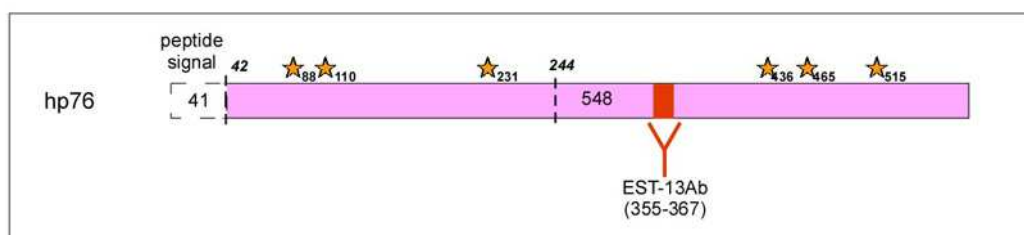


Figure 16. Schéma de l'épitope ciblé par l'anticorps EST-13Ab sur la séquence de hp76.

**Antigène et épitope ciblé**

LASDGATWADIFK (résidus 355-367 de hp76)

**Espèce reconnue**

p76 humaine

**Profil observé en Western blot :**

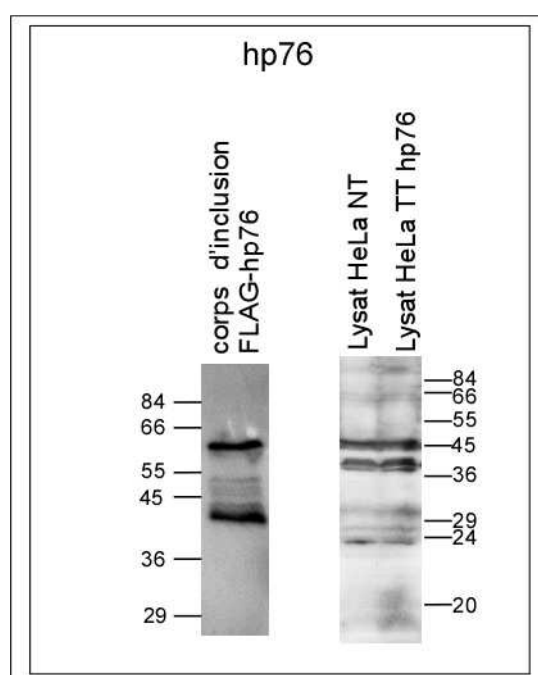


Figure 17. Analyse par Western blot d'échantillons de hp76 avec EST-13Ab.

Corps d'inclusion purifié à partir de *E.coli*/FLAG-hp76, lysat de HeLa transfectées de manière transitoire ou non avec le plasmide codant pour hp76 :  $5 \times 10^5$  cellules.

**Commentaire :**

Dans un lysat de cellules qui surexpriment hp76, EST-13Ab n'est pas spécifique.



## Nhp76Ab

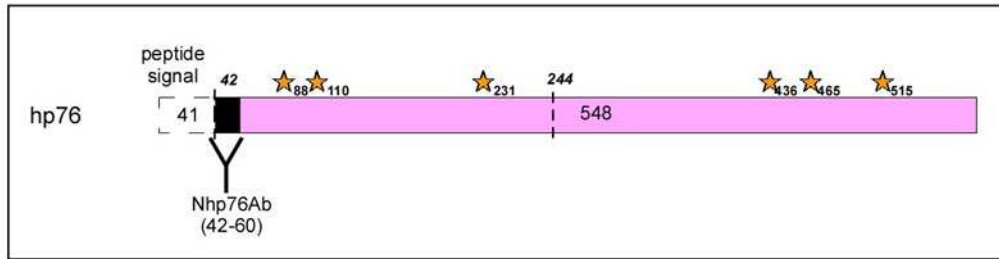


Figure 18. Schéma de l'épitope ciblé par l'anticorps Nhp76Ab sur la séquence de hp76.

**Antigène et épitope ciblé**

IPAPGGRWARDGQVPPASR (résidus 42-60 de hp76)

**Espèce reconnue**

p76 humaine

**Profil observé en Western blot :**

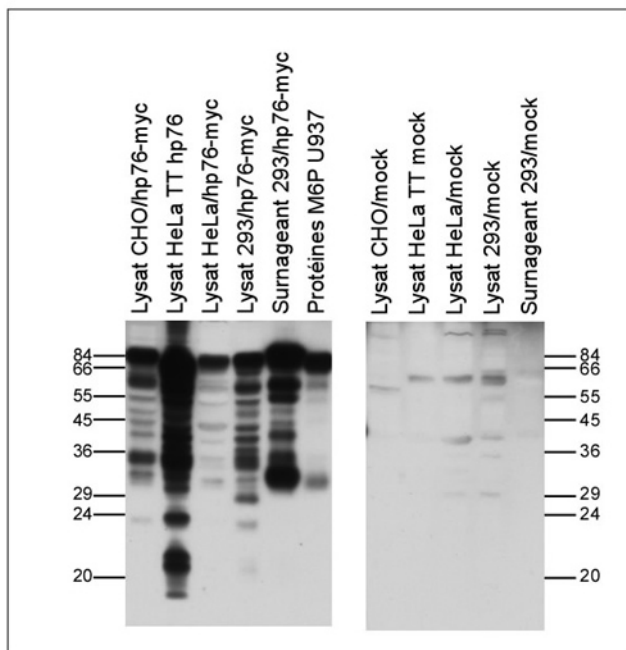


Figure 19. Analyse par Western blot d'échantillons de hp76 avec Nhp76Ab.

Lysats de CHO/hp76-myc, HeLa/hp76-myc et 293/hp76-myc, et « mock » correspondants :  $2,5 \times 10^5$  cellules, lysat de HeLa 1 jour après transfection transitoire par le plasmide codant pour hp76 ou le plasmide vide (HeLa TT/hp76 et HeLa TT/mock) :  $10^5$  cellules, surnageant de culture de cellules 293/hp76 ou 293/mock (SN 293/hp76 ou SN 293/mock) : 20  $\mu$ L, équivalent de  $10^5$  cellules, protéines M6P purifiées sur sCI-MPR de cellules U937 : équivalent de  $6 \times 10^6$  cellules.

**Commentaire :**

Sur ce Western blot, trop de matériel a été déposé, ne permettant pas d'avoir un résultat aisément interprétable.



## Crp76Ab

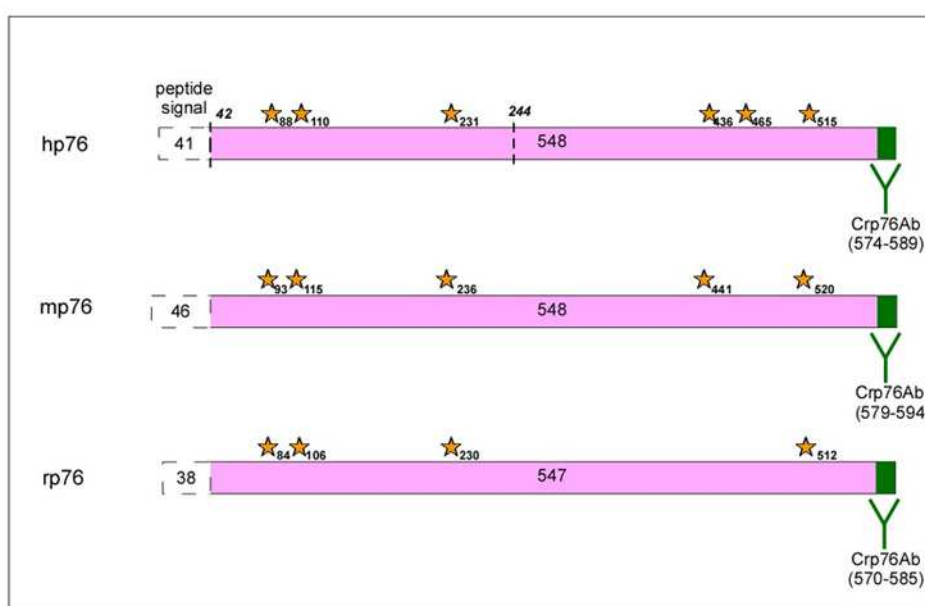


Figure 20. Schéma de l'épitope ciblé par l'anticorps Crp76Ab sur hp76, mp76 et de rp76.

**Antigène et épitope ciblé** SQPDLWMFSPVKVPWD (résidus 570-585 de rp76)

**Espèces reconnues** p76 humaine, p76 de rat, p76 de souris

**Profil observé en Western blot :**

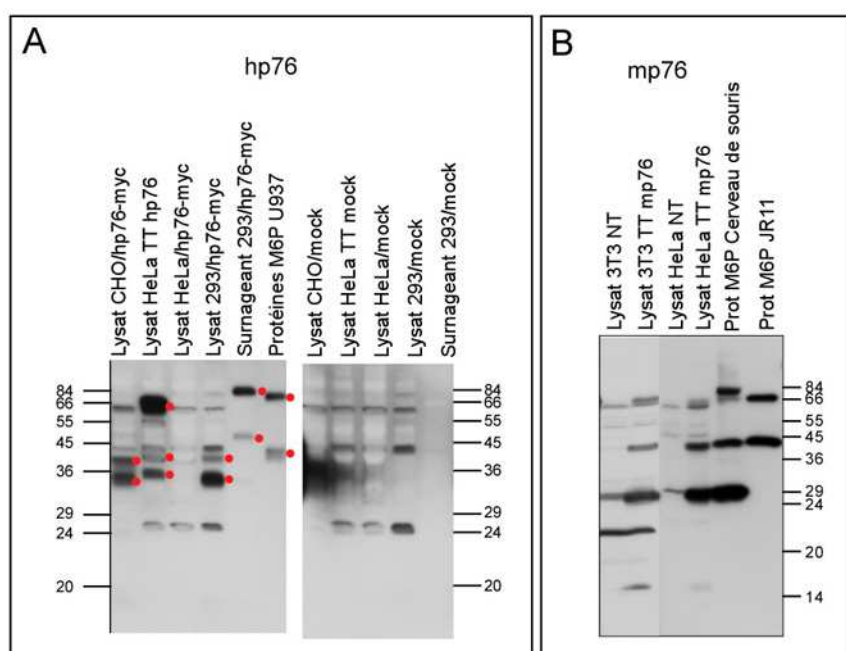


Figure 21. Analyse par Western blot d'échantillons de hp76 ou mp76 avec Crp76Ab.

A. Lysats de CHO/hp76-myc, HeLa/hp76-myc et 293/hp76-myc, et « mock » correspondants :  $2,5 \times 10^5$  cellules, lysat de HeLa 1 jour après transfection transitoire par le plasmide codant pour hp76 ou le plasmide vide (HeLa TT/hp76 et HeLa TT/mock) :  $10^5$  cellules, surnageant de culture de cellules 293/hp76 ou 293/mock (SN 293/hp76 ou SN 293/mock) :  $20 \mu\text{L}$ , équivalent de  $10^5$  cellules, protéines M6P purifiées sur sCI-MPR de cellules U937 : équivalent de  $6 \times 10^6$  cellules.

B. Lysats de cellules 3T3 ou HeLa non transfectées (NT) ou transfectées avec le plasmide codant pour mp76 :  $10^5$  cellules. Points rouges : espèces qui apparaissent avec la transfection.



## Irp76Ab

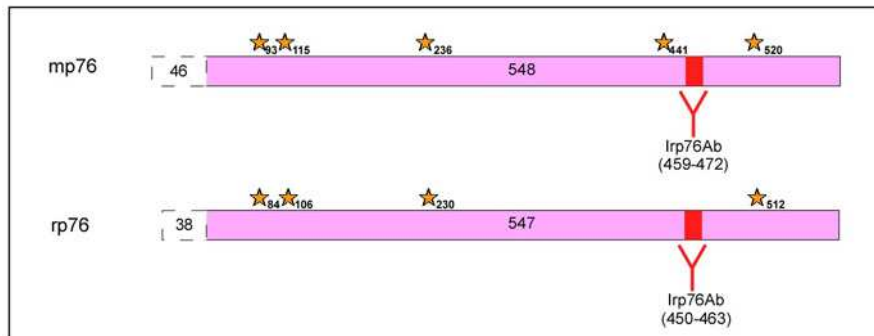


Figure 22. Schéma de l'épitope ciblé par l'anticorps Irp76Ab sur mp76 et rp76.

**Antigène et épitope ciblé** TRNPRAKIFQRDQS (résidus 570-585 de rp76)

**Espèces reconnues** p76 de rat, p76 de souris

**Profil observé en Western blot :**

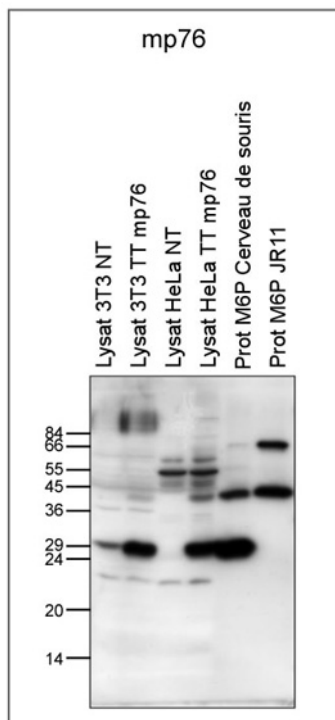


Figure 23. Analyse par Western blot d'échantillons de mp76 avec Irp76Ab. Lysats de cellules 3T3 ou HeLa non transfectées (NT) ou transfectées avec le plasmide codant pour mp76 :  $10^5$  cellules, protéines M6P purifiées sur sCI-MPR de cellules JR11 ou de cerveau de souris.





## Nmp76Ab

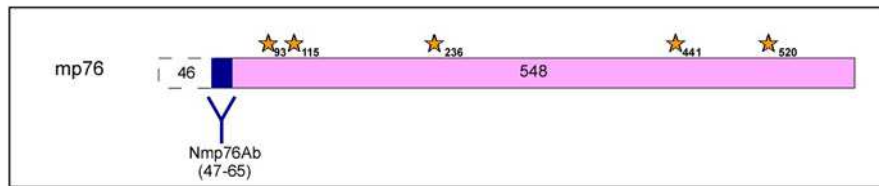


Figure 24. Schéma de l'épitope ciblé par l'anticorps Nmp76Ab sur mp76.

**Antigène et épitope ciblé** LPTLGPGWQRQNPDPPVSR (résidus 47-65 de mp76)

**Espèce reconnue** p76 de souris

**Profil observé en Western blot :**

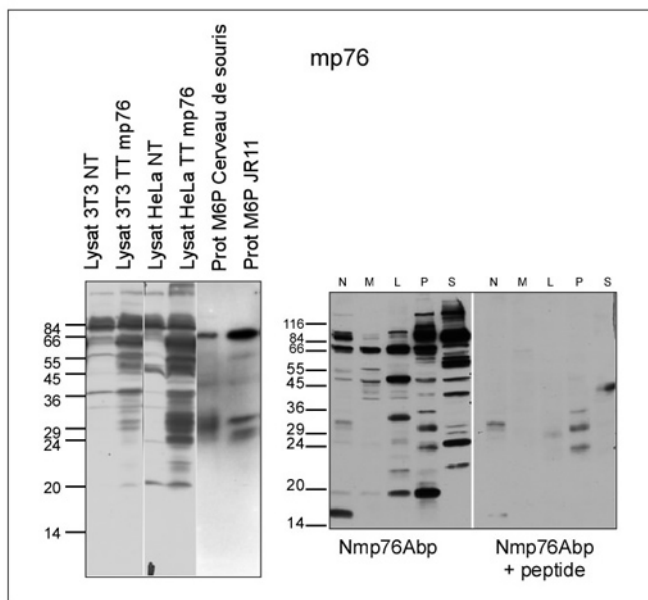


Figure 25. Analyse par Western blot d'échantillons de mp76 avec Nmp76Ab.

A gauche : Lysats de cellules 3T3 ou HeLa non transfectées (NT) ou transfectées avec le plasmide codant pour mp76 ( $10^5$  cellules), protéines M6P purifiées sur sCI-MPR de cellules JR11 ou de cerveau de souris.

A droite : échantillons du fractionnement subcellulaire de foie de souris (N : fraction nucléaire, M : mitochondriale lourde, L : mitochondriale légère et lysosomale, P : peroxisomale et microsomale et S : cytoplasmique). Une membrane a été incubée avec Nmp76Ab purifié (Nmp76Abp) ; l'autre avec Nmp76Abp avec son peptide antigénique (2 mg/mL), afin de d'identifier les espèces protéiques spécifiquement reconnues par Nmp76Ab.

**Commentaire :**

Sur des échantillons complexes (comme des lysats) Nmp76Ab manque de spécificité.



### 3. Expression et purification de p76 recombinante

Les trois principales sources de p76 recombinante qui ont été utilisées sont :

- FLAG-hp76 exprimée en bactérie,
- hp76-myc exprimée en CHO (lignée stable),
- hp76-myc exprimée en HEK 293-EBNA (lignée stable).

Pour chacune de ces espèces, une fiche d'identité résume les caractéristiques suivantes : origine du matériel principalement utilisé (cellules ou surnageant), estimation de la concentration en p76 recombinante obtenue, modes de purification employés, et analyses réalisées pour caractériser ce matériel. Les protocoles de production et de purification sont détaillés dans le chapitre « BIOCHIMIE ».

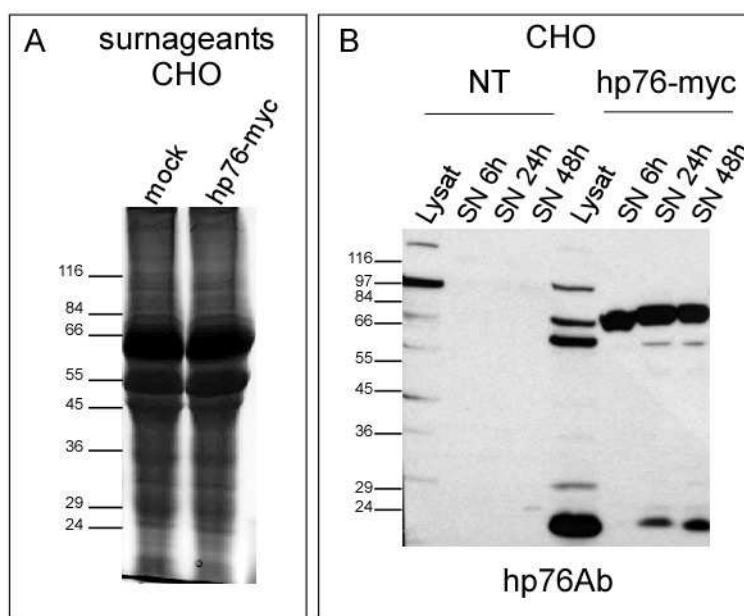
#### 3. 1. FLAG-p76

<b>Source :</b>	bactéries (corps d'inclusion)
<b>Concentration en FLAG-p76 (estimation) : après purification</b>	130 mg/L
<b>Mode de concentration/ purification :</b>	fractionnement avec BugBuster (Novagen), lavages extensifs des corps d'inclusion
<b>Emploi :</b>	fabrication d'anticorps (hp76Ab)
<b>Caractérisation (SDS-PAGE/Western blot/MALDI-TOF)</b>	cf Annexe 1.



### 3. 2. Production de hp76-myc par les cellules CHO/hp76-myc

<b>Source :</b>	Surnageant de culture
<b>Concentration en p76-myc (estimation) : (dans le surnageant brut)</b>	inférieure à 10 µg/L
<b>Mode de concentration/ purification :</b>	précipitation au sulfate d'ammonium
<b>Emploi :</b>	tests fonctionnels
<b>Caractérisation en SDS-PAGE/Western blot :</b>	



**Figure 26. Analyse des surnageants de culture de cellules CHO hp76-myc.**

(A) Analyse en gel SDS-PAGE (10% de polyacrylamide) et coloration au bleu de Coomassie avec l'équivalent de 8 mL de surnageant de culture (précipité au sulfate d'ammonium), soit approximativement les sécrétions de  $8 \times 10^6$  cellules. Le contrôle négatif est la lignée CHO/mock. Les protéines très abondantes visualisées à 66, 55 et 45 kDa proviennent du Nutridoma (composé la transferrine, d'albumine et d'insuline, respectivement)

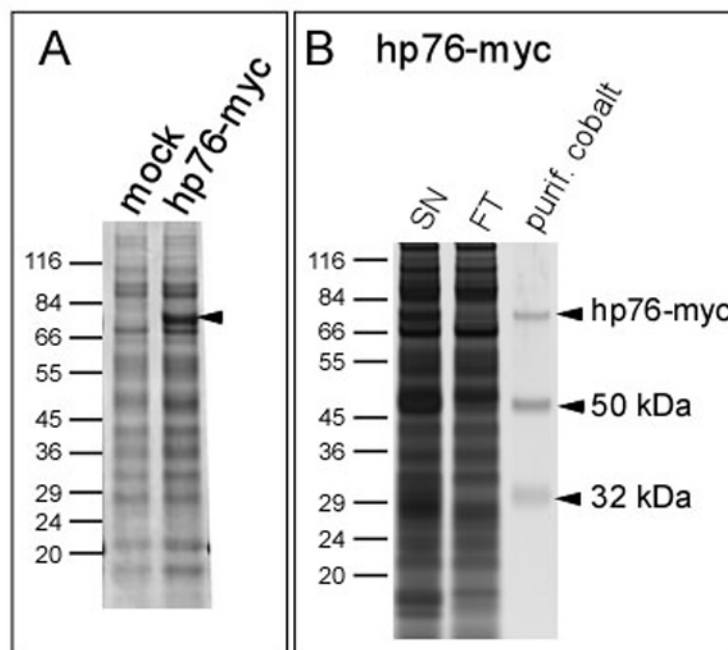
(B) Analyse par Western blot (avec l'anticorps hp76Ab). Les dépôts représentent les sécrétions de  $10^6$  cellules sur 6 h, 24h et 48h. Le contrôle négatif est la lignée CHO/NT. Un lysat des lignées a également été analysé ( $5 \times 10^5$  cellules).



### 3. 3. Production de hp76-myc par la lignée 293/hp76-myc

<b>Source :</b>	Surnageant de culture
<b>Concentration en p76-myc (estimation) : (dans le surnageant brut)</b>	150 µg/L
<b>Mode de concentration/ purification :</b>	précipitation au sulfate d'ammonium  concentration par ultrafiltration  purification sur colonne IMAC d'ion cobalt
<b>Concentration en p76-myc (estimation) : (après purification sur colonne IMAC d'ion cobalt)</b>	150 µg/mL
<b>Emploi :</b>	tests fonctionnels, fat blot, internalisation par les cellules ICD

#### Caractérisation en SDS-PAGE/Western blot :



**Figure 27. Analyse des surnageants de cellules 293/hp76-myc.**

(A) Analyse en gels SDS-PAGE (gradient 4-12 % de polyacrylamide, NuPage) et coloration au bleu de Coomassie de surnageants de cellules 293/hp76-myc et 293/mock (1 mL de surnageant initial).

(B) Analyse en gels SDS-PAGE (gradient 4-12 % de polyacrylamide, NuPage) et coloration au nitrate d'argent de surnageant de cellules 293/hp76-myc purifié sur une colonne IMAC d'ion cobalt. Les échantillons sont SN : surnageant initial (équivalent de 420 µL), FT : surnageant après 2 passages sur la colonne IMAC d'ion cobalt (« Flow Through ») (équivalent de 420 µL de surnageant initial), purif. cobalt : éluat de la colonne IMAC d'ion cobalt, concentré 1000 fois et dialysé (équivalent de 1 mL de surnageant initial).





## **RÉSULTATS ET DISCUSSION**



## RESULTATS ET DISCUSSION

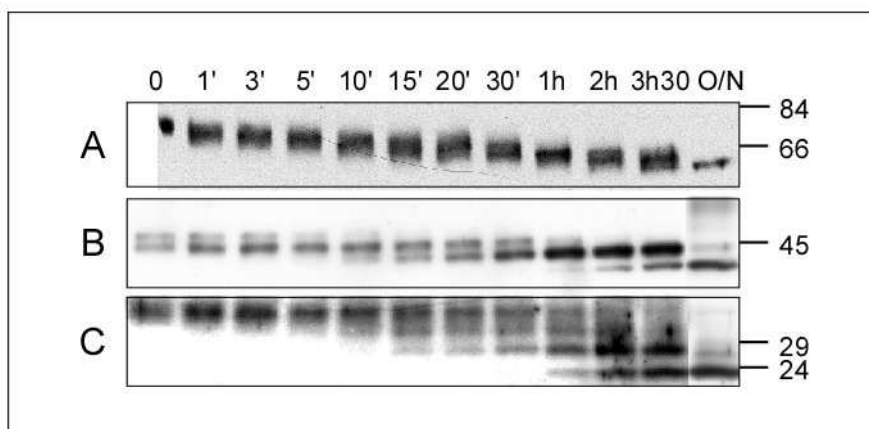
### I. CHAPITRE I : CARACTERISATIONS BIOCHIMIQUES DE P76

Comme p76 a été identifiée parmi des protéines porteuses de sucres mannose-6-phosphate (M6P), des expériences ont été réalisées pour déterminer le nombre de N-glycosylations portés par p76 et vérifier la présence effective de sucres M6P. Nos analyses ont également montré que les formes humaine et murine de p76 (hp76 et mp76) étaient sujettes à une maturation protéolytique, que nous avons cherché à caractériser.

#### 1. Nombre de glycosylations de hp76

L'analyse *in silico* de la séquence de hp76 par des logiciels de bioinformatique prédit six sites de N-glycosylations potentielles. Pour déterminer expérimentalement le nombre réel de N-glycosylations de hp76, une expérience de déglycosylation cinétique a été réalisée, à partir d'un échantillon de protéines M6P de cellules U937 purifiées par affinité sur une colonne de récepteur au mannose-6-phosphate cation-indépendant soluble bovin (sCI-MPR) immobilisé. Ces protéines ont été déglycosylées avec la PNGase F en quantité suffisamment faible pour que le processus complet dure plusieurs heures. Par une analyse en Western blot d'échantillons prélevés à différents temps, on observe l'apparition et la disparition de bandes de masse moléculaire décroissante, allant de 76 à environ 60 kDa. Elles correspondent aux différentes formes de hp76 avec un nombre décroissant de N-glycosylations (Figure 28A). Cependant la résolution du gel ne permet pas de compter précisément le nombre de formes, donc de déterminer le nombre de glycosylations.

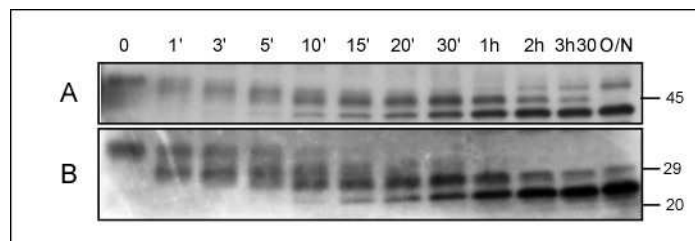
La forme précurseur de hp76 de 76 kDa est clivée et donne deux fragments de 32 et 45 kDa, respectivement N- et C-terminaux (cf paragraphe 3. 3. 2 de ce chapitre). Nous avons donc analysé la déglycosylation cinétique de ces deux fragments en déposant 5 fois plus de matériel protéique par piste.



**Figure 28. Détermination du nombre de N-glycosylations sur hp76 provenant des protéines M6P de U937.** Des protéines M6P de U937 purifiées ont été déglycosylées par la PNGase F pendant la durée indiquée pour chaque piste, puis séparées sur des gels SDS-PAGE à 7,5% d'acrylamide (A, avec l'équivalent de  $6 \times 10^6$  cellules par piste) ou à 9% d'acrylamide (B et C, avec l'équivalent de  $3 \times 10^7$  cellules par pistes) et analysé par Western blot. Pour B et C, de la PNGase F a été ajoutée pour obtenir un taux de déglycosylation maximal pour le point sur 15 heures (O/N) et a été analysé sur un Western blot à part. Le précurseur a été analysé avec l'anticorps hp76Ab (A), le fragment C-terminal avec Crp76Ab (B) et le fragment N-terminal avec Nhp76Ab (C).

Le fragment à 45 kDa apparaît sous la forme d'un doublet en Western blot (Figure 28B, temps 0). La déglycosylation cinétique de ce doublet (correspondant au fragment C-terminal de hp76) fait clairement apparaître deux formes supplémentaires, avec un fragment totalement déglycosylé à 38 kDa (Figure 28B). Ainsi le doublet initial représente un mélange de polypeptides portant 2 et 3 N-glycosylations, en quantité approximativement équivalente, d'après leur intensité. Enfin, la déglycosylation du fragment à 32 kDa fait apparaître trois formes supplémentaires, avec un fragment totalement déglycosylé de 22 kDa (Figure 28C). Le fragment N-terminal de hp76 comporte donc 3 N-glycosylations. Ainsi, les 6 sites prédits du précurseur hp76 sont effectivement N-glycosylés ; un des sites de l'extrémité C-terminale l'est de manière hétérogène.

Cette expérience a également été réalisée sur la protéine recombinante sécrétée par les cellules 293/hp76-myc. Un clivage similaire du précurseur est également observé sur cette forme, et donne deux fragments de 32 et 50 kDa, N- et C-terminaux respectivement. Le fragment C-terminal de 50 kDa n'apparaît cependant pas sous la forme d'un doublet. Le résultat de la déglycosylation cinétique de hp76-myc et de ses fragments est le même que précédemment : les 4 paliers de déglycosylation pour les deux fragments à 32 et 50 kDa témoignent de 3 N-glycosylations par fragment (Figure 29).



**Figure 29.** Détermination du nombre de N-glycosylations sur hp76-myc sécrétée par la lignée 293/hp76-myc.

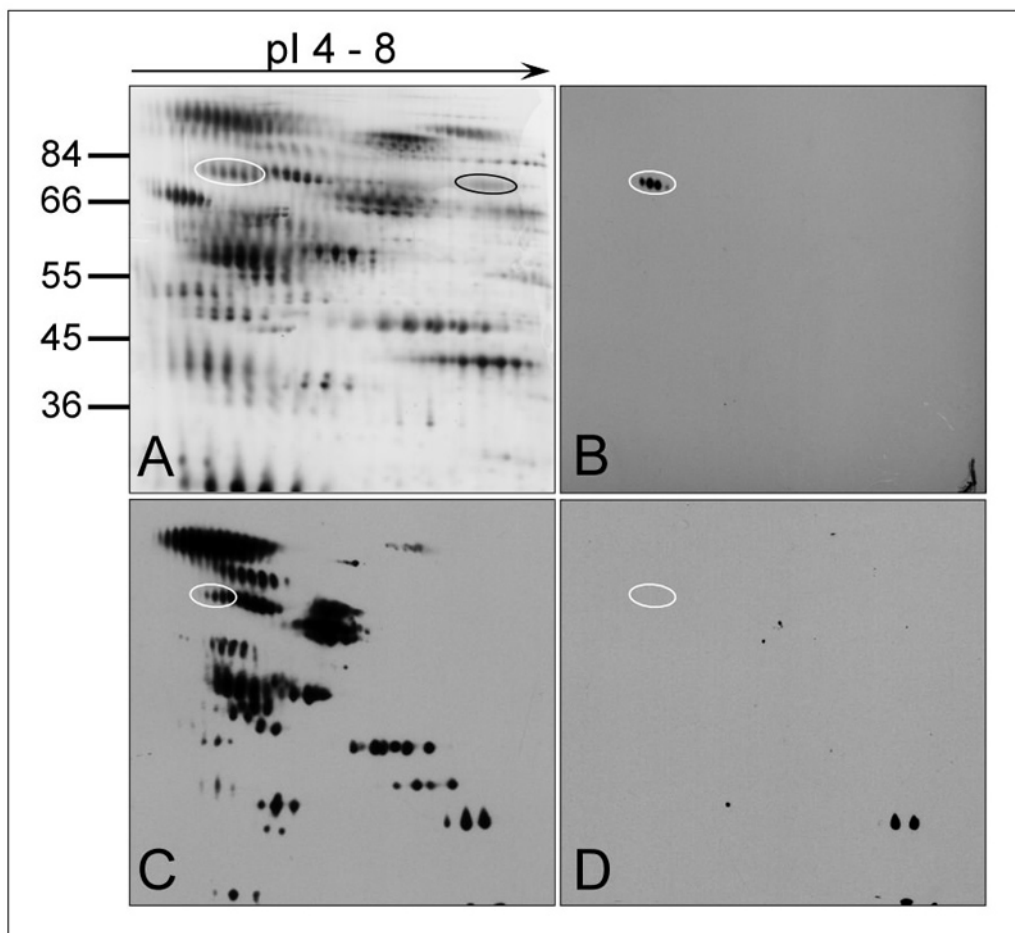
Le surnageant de cellules 293/hp76-myc a été déglycosylé par la PNGase F pendant la durée indiquée sur chaque piste, déposé sur un gel SDS-PAGE à 8% d'acrylamide et transféré pour une analyse par Western blot avec l'anticorps C-terminal Crp76Ab (A) ou avec l'anticorps N-terminal hp76Ab (B).

## 2. Mannose-6-phosphorylation de hp76

### 2. 1. Reconnaissance directe de hp76 par le sCI-MPR

Lors des analyses protéomiques ayant permis d'identifier hp76, nous avons utilisé un protocole de purification reposant sur une colonne de chromatographie d'affinité sur laquelle est greffé du sCI-MPR. Par ce protocole, certaines protéines pourraient être purifiées du fait de leur association à des protéines porteuses de M6P, sans porter elles-mêmes du M6P. Il convenait donc de vérifier que hp76 comportait effectivement des sucres M6P parmi ses N-glycosylations. Pour vérifier ce point, un overlay a été réalisé : des protéines M6P, purifiées par affinité sur une colonne de sCI-MPR à partir de cellules U937 ont été séparées sur un gel bidimensionnel puis transférées sur une membrane de nitrocellulose. Cette membrane a été incubée avec du sCI-MPR soluble biotinylé.

hp76 se trouve parmi les nombreuses protéines reconnues directement par le sCI-MPR (Figure 30C). Sa position dans le motif des protéines M6P séparées sur gel 2D est connue grâce à l'analyse protéomique (Figure 30A et Introduction, Figure 7) et grâce à une analyse par Western blot réalisée avec l'anticorps hp76Ab (Figure 30B). L'interaction entre le sCI-MPR et hp76 est spécifiquement inhibée par du M6P exogène ajouté à la solution de sCI-MPR biotinylé (Figure 30D), ce qui prouve que hp76 porte effectivement des sucres M6P.



**Figure 30.** Expérience d'overlay avec le sCI-MPR biotinylé.

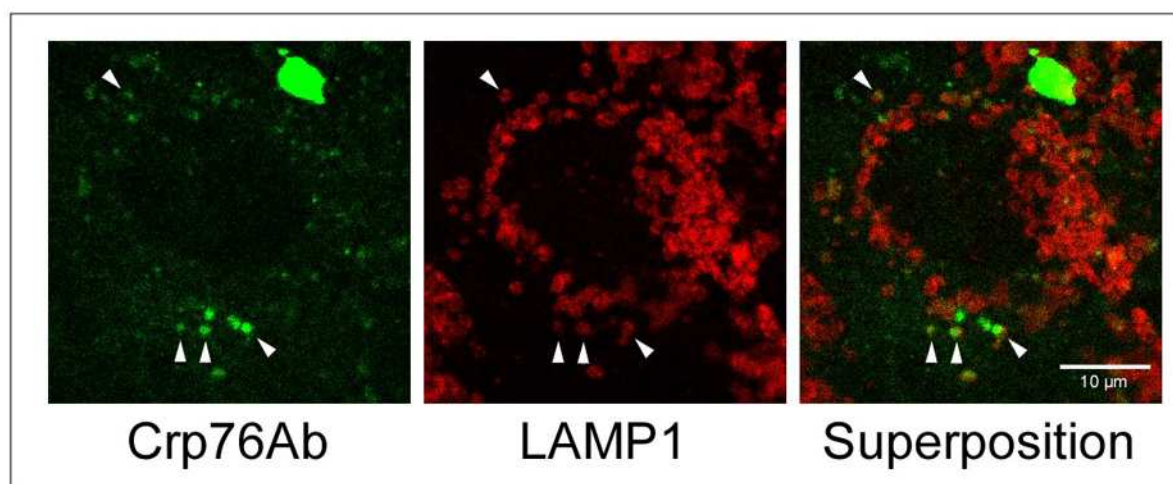
Les protéines M6P purifiées à partir du surnageant de 2,5 milliards de cellules U937 ont été séparées sur un gel 2D (20x20 cm, gradient de pH linéaire 4 à 8, 10% d'acrylamide), puis colorées au bleu colloïdal (A). Les protéines M6P purifiées par affinité à partir du surnageant de  $2 \times 10^8$  cellules U937 ont été séparées sur un gel 2D (9x9 cm, gradient de pH linéaire 4 à 8, 10% d'acrylamide), transférées sur une membrane de nitrocellulose et révélées avec hp76Ab (B) ou avec 3,3 nM sCI-MPR biotinylé avec (D) ou sans (C) 5 mM de M6P. Les cercles blancs indiquent les spots où hp76 a été identifiée majoritairement, et celui en noir indique la série de spots peu intenses où un seul peptide hp76 a été trouvé (cf Introduction).

## 2. 2. Internalisation de hp76-myc purifiée par des cellules ICD

Les fibroblastes ICD sont des cellules qui ne contiennent pas ou très peu d'hydrolases lysosomales, car elles ont une déficience en UDP-GlcNac phosphotransférase, l'enzyme qui synthétise l'étiquette M6P sur les hydrolases lysosomales. Les protéines lysosomales néosynthétisées n'ayant pas de sucres M6P, elles ne peuvent pas être reconnues par les MPR. Elles n'atteignent pas les lysosomes et sont sécrétées dans le milieu extracellulaire. Ces fibroblastes ont des gros lysosomes (des « inclusions ») du fait de l'accumulation de substrats non dégradés.

La présence de sucres M6P sur une protéine peut être vérifiée en regardant si elle est internalisée par endocytose par les CI-MPR présents à la surface des cellules en culture. Cette

expérience a été réalisée avec des cellules ICD car l'activité des protéases intracellulaires est faible comparée à celle des fibroblastes normaux. Les fibroblastes ICD sont incubés avec hp76-myc, provenant de surnageant de cellules 293/hp76-myc, purifiée sur une colonne IMAC d'ion cobalt par son étiquette myc-His<sub>6</sub> et concentrée 600 fois par rapport au surnageant initial. Après 5 heures d'incubation, les cellules sont fixées pour une analyse en immunofluorescence (IF). Les lysosomes sont marqués par un anticorps anti-LAMP-1 et hp76-myc est révélée par Crp76Ab (Figure 31). On remarque que dans ce type de cellule, les lysosomes sont nettement plus gros que dans les cellules HeLa. Dans ces conditions, le marquage par Crp76Ab donne un bruit de fond assez important et marque des agrégats. Cependant, un marquage hp76-myc est concentré à l'intérieur de certaines cellules. Les flèches blanches de la Figure 31 montrent que hp76-myc a bien été internalisée. Elle se trouve à l'intérieur de compartiments LAMP-1 positifs, qui forment des anneaux. Cependant, hp76-myc est exclue des lysosomes les plus gros (qui remplissent la plus grande partie du cytoplasme) et les plus intensément marqués par LAMP-1. Des incubations plus longues ont été tentées (jusqu'à 24 heures) mais hp76-myc n'a plus été observée dans les cellules.



**Figure 31. Internalisation de hp76-myc purifiée par des cellules ICD.**  
Les flèches blanches désignent les lysosomes où hp76-myc est présente.

Cette expérience montre que de la p76 exogène est bien internalisée dans des cellules ICD, ciblée aux lysosomes, probablement par l'intermédiaire des CI-MPR présents à la membrane plasmique. Pour l'affirmer, il aurait fallu réaliser la même expérience en incubant ces cellules avec hp76-myc et du M6P exogène. Cependant, ce point a été vérifié par un autre groupe, avec un modèle expérimental un peu différent, dans lequel la forme murine recombinante de p76 est internalisée par des fibroblastes humains ICD, mais ne l'est plus en présence de 5 mM de M6P (Kollmann et al., 2005).

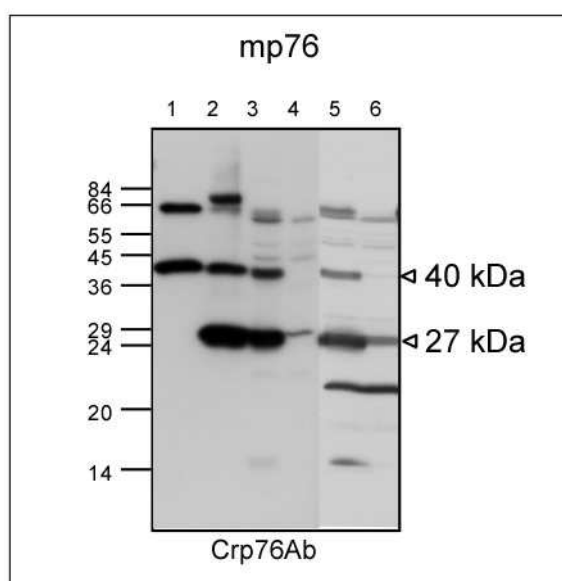


### 3. Maturation de p76 chez la souris et chez l'homme

Nous avons décidé d'étudier la maturation de p76 en parallèle sur la forme humaine et la forme murine. Ainsi, pour caractériser la forme humaine, nous disposons de lignées cellulaires, alors que pour la forme murine, des tissus sont également facilement disponibles.

#### 3. 1. Maturation de mp76

Tout d'abord, pour connaître la forme de mp76 *in vivo*, un extrait de cerveau de souris a été purifié sur une colonne de sCI-MPR. Dans le cerveau, les protéines lysosomales sont déphosphorylées beaucoup plus lentement que dans les autres organes (Jadot et al., 1999; Sleat et al., 1996). Ainsi, c'est le seul organe où la purification de protéines lysosomales matures est possible par affinité sur une colonne de sCI-MPR immobilisé. Dans cet échantillon, nous observons la présence de deux fragments C-terminaux de 40 et 27 kDa, détectés avec nos deux anticorps C-terminaux, Crp76Ab (Figure 32, piste 2) et Irp76Ab (cf Matériel et méthodes, Figure 23). Une bande à une masse moléculaire de 80 kDa est également détectée, uniquement avec Crp76Ab.



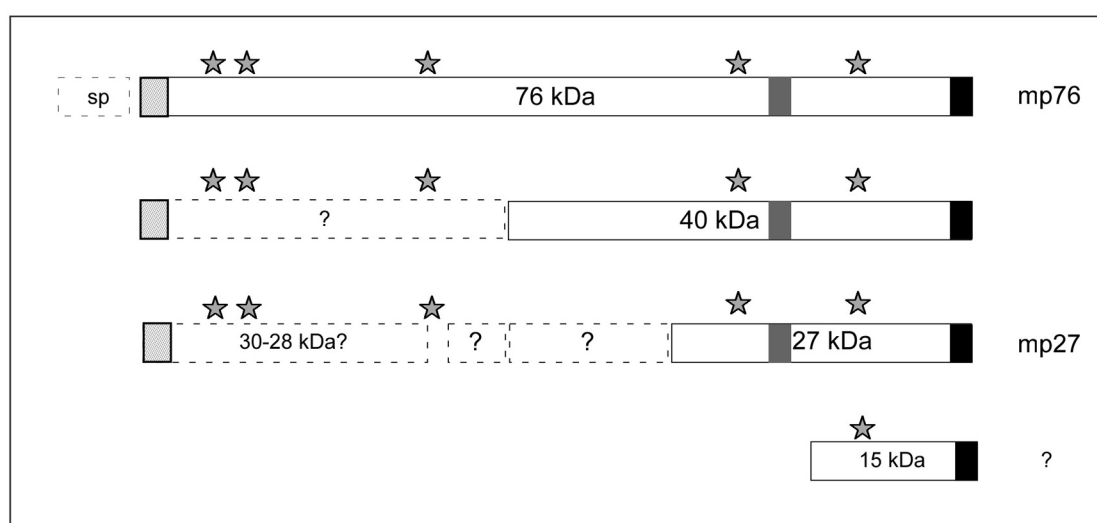
**Figure 32. Analyse par Western blot d'échantillons de souris contenant mp76.**

Les échantillons sont : des protéines M6P purifiées à partir de surnageant de JR11 par affinité sur une colonne de sCI-MPR (piste 1), un extrait de protéines M6P purifiées à partir de cerveau de souris sur une colonne de sCI-MPR (piste 2), des lysats de cellules HeLa et 3T3 récoltées 4 jours après transfection avec le plasmide codant pour mp76 (pistes 3 et 5, respectivement) ou des lysats de cellules HeLa ou 3T3 non transfectées (pistes 4 et 6, respectivement). Le Western blot est révélé avec l'anticorps C-terminal Crp76Ab.

Ensuite, nous avons comparé ce profil à celui obtenu dans des lysats de cellules qui surexpriment mp76. A nouveau, deux fragments majoritaires de 40 et 27 kDa sont visualisés (Figure 32, pistes 3 et 5) dans les deux types cellulaires dans lesquels la transfection a été

réalisée (HeLa et 3T3). Enfin, dans un échantillon de protéines M6P purifiées à partir de sécrétions de JR11 sur une colonne de sCI-MPR, le précurseur de mp76 de 76 kDa et la bande C-terminale de 40 kDa sont détectés (Figure 32, piste 1). Il est connu que les protéines lysosomales sécrétées sont majoritairement sous leur forme précurseur (Hasilik and Neufeld, 1980). L'absence du fragment de 27 kDa dans cet échantillon semble indiquer que le clivage protéolytique subi par le fragment de 40 kDa pour donner le fragment de 27 kDa a lieu après la bifurcation entre la voie de sécrétion constitutive et la voie de ciblage vers les lysosomes.

Notre hypothèse est donc que le précurseur de 76 kDa est clivé pour générer un fragment C-terminal de 40 kDa, qui est à son tour clivé en un fragment majoritaire de 27 kDa (Figure 33).



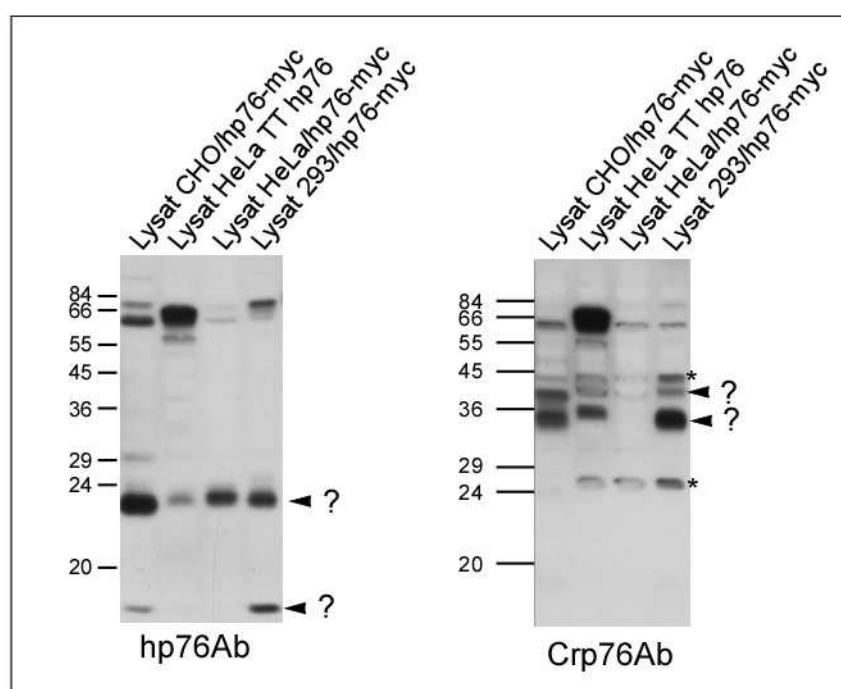
**Figure 33. Schéma de maturation de la p76 de souris (mp76) établi à partir des analyses par Western blot.**

Une analyse similaire réalisée avec l'anticorps Nmp76Ab ciblant le peptide N-terminal de mp76 ne donne pas un résultat clair. Cet anticorps reconnaît le précurseur de mp76 et un doublet migrant vers 28-30 kDa dans des mélanges peu complexes comme des protéines M6P purifiées à partir de cerveau ou de surnageant de fibroblastes (cf Matériel et méthodes Figure 25). Mais cet anticorps n'est pas assez spécifique car dans les lysats de cellules transfectées, de très nombreuses espèces protéiques sont reconnues et ce, malgré la purification sur le peptide antigénique.

### 3. 2. Maturation intracellulaire de hp76

La maturation intracellulaire de hp76 a été observée en analysant les lysats des lignées qui la surexpriment avec nos différents anticorps. Le résultat de ces analyses est beaucoup moins

clair que dans le cas de mp76 : par exemple, l'anticorps C-terminal reconnaît un ou deux fragments C-terminaux selon la lignée, dont les masses moléculaires varient entre 40 et 32 kDa (Figure 34 et cf Matériel et Méthodes, Figure 21). Les analyses avec les anticorps N-terminaux présentent des profils très différents : avec hp76Ab, un fragment est détecté dans toutes les lignées vers 23 kDa, mais la masse moléculaire n'est pas exactement la même dans chaque lignée. Un fragment de 16 kDa est également présent dans certaines lignées (Figure 34 et Matériel et Méthodes, Figure 15). Le profil visualisé avec Nhp76Ab est encore plus complexe et n'est pas interprétable (cf Matériel et Méthodes, Figure 19).

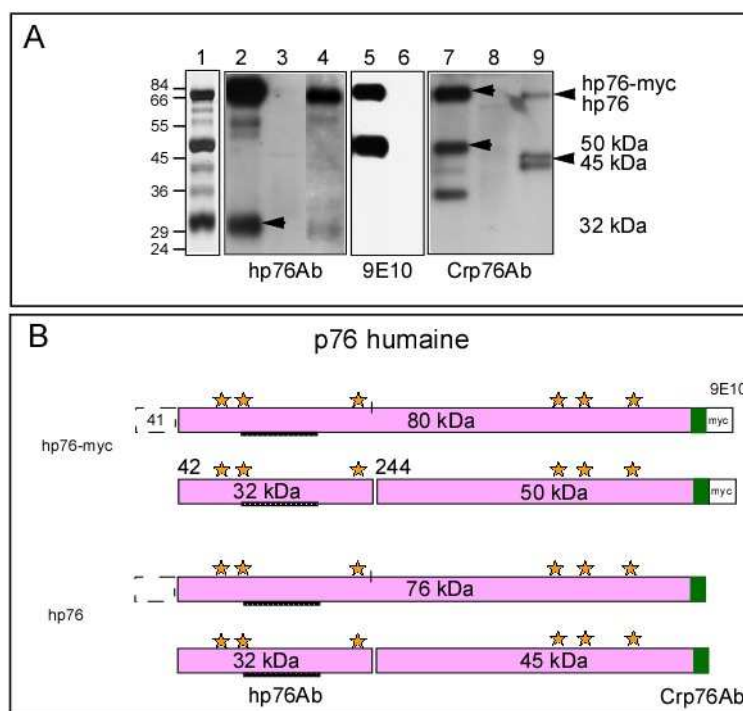


**Figure 34.** Analyse des lysats de lignées surexprimant hp76, par Western blot avec hp76Ab et Crp76Ab. Le détail de la composition des échantillons est indiqué Figure 15 et Figure 21. Les astérisques désignent des bandes non spécifiques observées dans les échantillons « mock ».

### 3. 3. Maturation de hp76 sécrétée

#### 3. 3. 1. La protéine recombinante hp76-myc sécrétée subit un clivage majoritaire

Le surnageant de culture des cellules 293/hp76-myc a été purifié par affinité sur une colonne de sCI-MPR : trois polypeptides majoritaires de 80, 50 et 32 kDa sont purifiés (Figure 35A, piste 1). Quelques fragments minoritaires de 63, 58, 40 et 36 kDa sont également présents.



**Figure 35. Caractérisation des espèces protéiques dérivées de hp76 sécrétée.**

(A) Les protéines ont été séparées sur un gel SDS-PAGE à 12% d'acrylamide et ont été colorées au nitrate d'argent (piste 1) ou transférées pour une analyse par Western blot avec les anticorps hp76Ab (pistes 2 à 4), 9E10 (pistes 5 et 6) et Crp76Ab (pistes 7 à 9). Piste 1 : protéines du surnageant de culture des cellules 293/hp76-myc purifiées par affinité sur une colonne de sCI-MPR ; pistes 2, 5 et 7 : surnageant de culture de cellules 293/hp76-myc ; pistes 3, 6 et 8 : surnageant de culture de cellules 293/mock ; pistes 4 et 9 : protéines M6P de cellules U937 purifiées sur colonne de sCI-MPR.

(B) Schéma de maturation de hp76-myc et hp76 endogène d'après les données de Western blot et de séquençage N-terminal (cf texte).

Un séquençage N-terminal réalisé sur les trois espèces majoritaires (Tableau 11) montre que les espèces de 80 et 32 kDa ont la même séquence N-terminale qui débute au résidu 42. Le fragment de 50 kDa a une séquence N-terminale débutant au résidu 244. Ainsi, un clivage du précurseur de hp76-myc ayant lieu entre les résidus 243 et 244 génère un fragment N-terminal de 32 kDa et un fragment C-terminal de 50 kDa (Figure 35B).

**Tableau 11. Résultat du séquençage N-terminal des polypeptides purifiés de surnageant 293/hp76-myc.**

Masse moléculaire apparente	séquence N-terminale	Résidus <sup>a</sup>
80 kDa	IPAPGGRW	42 – 49
50 kDa	CSALIKL	244 -250
32 kDa	IPAPGGRW	42 - 49

<sup>a</sup> la numérotation des résidus est celle de la protéine hypothétique LOC196463.

Une analyse par Western blot des surnageants de culture des cellules 293/hp76-myc et 293/mock avec nos anticorps confirme ces données. De manière prévisible, tous les anticorps reconnaissent le précurseur de 80 kDa : il correspond à la séquence entière de hp76 prolongée de son étiquette myc-His<sub>6</sub> de 28 acides aminés, qui l'alourdit d'environ 4 kDa. De même, l'anticorps 9E10, qui reconnaît l'épitope myc, détecte les espèces de 80 kDa et 50 kDa (Figure 35A, pistes 5 et 6).

L'anticorps hp76Ab reconnaît fortement les espèces de 80 kDa et 32 kDa, et faiblement la bande à 58 kDa (Figure 35A, pistes 2 et 3). Ceci démontre clairement que l'anticorps hp76Ab est uniquement dirigé contre un épitope N-terminal de hp76 car il ne reconnaît que le fragment de 32 kDa et pas celui de 50 kDa.

L'anticorps C-terminal Crp76Ab reconnaît bien la bande C-terminale à 50 kDa. Il détecte aussi deux espèces C-terminales de 36 et 40 kDa (Figure 35A, pistes 7,8). Elles ont perdu l'étiquette myc-His<sub>6</sub> car elles ne sont pas reconnues par l'anticorps 9E10.

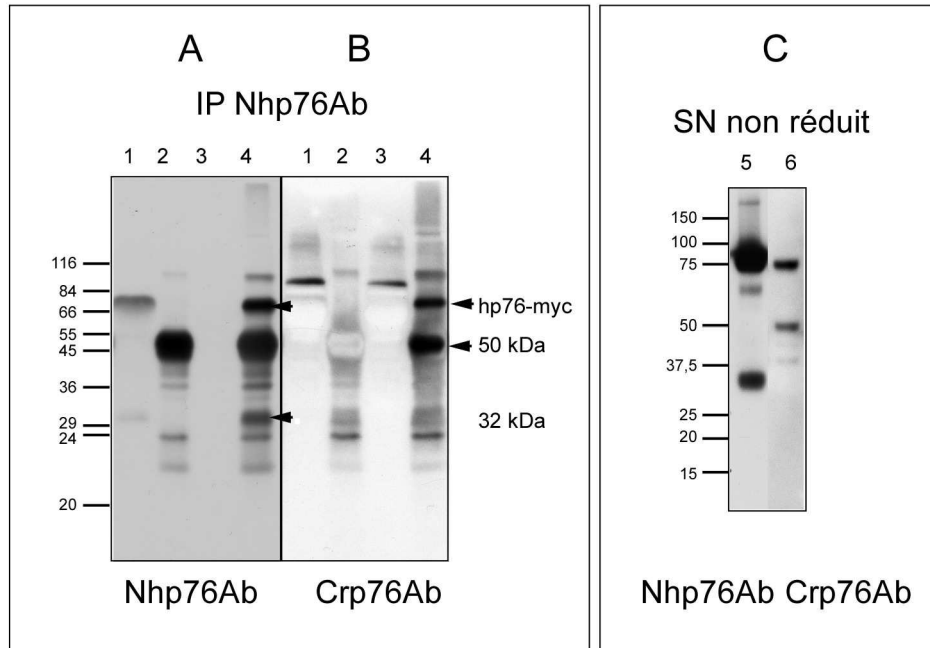
Par ailleurs, le séquençage N-terminal apporte également une information sur le site exact de clivage du peptide signal. Il se situe entre les résidus 41 et 42 (Tableau 11) comme il était proposé par le logiciel de prédiction SignalP 3.0.

### 3. 3. 2. La protéine endogène hp76 purifiée à partir des sécrétions de cellules U937 subit un clivage similaire à celui de la protéine recombinante

Une coupure est également observée sur hp76 endogène présente dans les protéines M6P de cellules U937 purifiées par affinité sur une colonne de sCI-MPR : un polypeptide de 32 kDa est révélé, faiblement, avec l'anticorps N-terminal hp76Ab (Figure 35A, piste 4) et un doublet vers 45 kDa est révélé avec l'anticorps C-terminal Crp76Ab (Figure 35A, piste 9). La différence de migration entre les fragments C-terminaux de hp76-myc et de hp76 de cellules U937 (la bande à 50 kDa et le doublet à 45 kDa, respectivement) est très certainement due à l'étiquette myc-His<sub>6</sub> présente uniquement sur la protéine hp76 recombinante (Figure 35B). L'apparence sous forme d'un doublet de ce fragment est due à un site glycosylé de manière hétérogène (cf paragraphe 1).

### 3. 3. 3. Les deux chaînes N- et C-terminales sont associées par une liaison non-covalente

Afin de savoir si les deux fragments de 50 et 32 kDa issus de hp76-myc sont associés dans le surnageant, une expérience d'immunoprécipitation (IP) a été réalisée à partir de surnageant de 293/hp76-myc avec l'anticorps Nhp76Ab.



**Figure 36.** Expérience d'immunoprécipitation à partir des surnageants de 293/hp76-myc. Analyse par Western blot de surnageants de 293/hp76-myc immunoprécipités (IP) avec l'anticorps Nhp76Ab. La même membrane a été révélée d'abord avec Nhp76Ab (A), puis avec Crp76Ab (B), l'anticorps secondaire utilisé pour la révélation n'étant pas le même (cf texte). Les échantillons sont les suivants : surnageant déplété après incubation avec le sérum non immun (SNI) (pistes 1), espèces immunoprécipitées avec le SNI (pistes 2), surnageant déplété après incubation avec le sérum Nhp76Ab (pistes 3), espèces immunoprécipitées avec Nhp76Ab (pistes 4). (C) Le surnageant de culture de cellules 293/hp76-myc a été analysé par SDS-PAGE dans des conditions non réductrices, puis le gel a été transféré sur une membrane de nitrocellulose pour une analyse en Western blot avec les anticorps Nhp76Ab (piste 5) et Crp76Ab (piste 6).

Une analyse par Western blot des espèces immunoprécipitées par Nhp76Ab a identifié le précurseur hp76-myc de 80 kDa et le fragment de 32 kDa par une révélation en Western blot avec ce même anticorps (Figure 36A). Ce résultat est cohérent car ces espèces contiennent l'extrémité N-terminale de hp76-myc, reconnue par Nhp76Ab (Figure 36A, piste 4, flèches). Une bande de 50 kDa très intense est également révélée dans les deux pistes correspondant à l'élution (Figure 36A, pistes 2 et 4). Cette bande correspond à la chaîne lourde des anticorps du sérum non immun ou de Nhp76Ab qui ont servi à l'IP, qui ont été élués des billes et qui ont migré dans le gel SDS-PAGE. Afin de savoir si le fragment C-terminal de hp76-myc était aussi immunoprécipité par Nhp76Ab, la même membrane de Western blot a été déshybridée (cf Matériel et Méthodes) puis analysée avec l'anticorps Crp76Ab. Comme le fragment C-terminal recherché migre à 50 kDa, un anticorps secondaire différent a été utilisé pour le distinguer des chaînes lourdes des anticorps qui migrent aussi à 50 kDa. Il s'agit d'un anticorps secondaire couplé à la peroxidase qui reconnaît les anticorps primaires uniquement sous leur forme native (et non dénaturée comme c'est le cas quand ils sont mis en présence de SDS, dans le tampon de Laemmli). Dans ce cas, la chaîne lourde des anticorps n'est

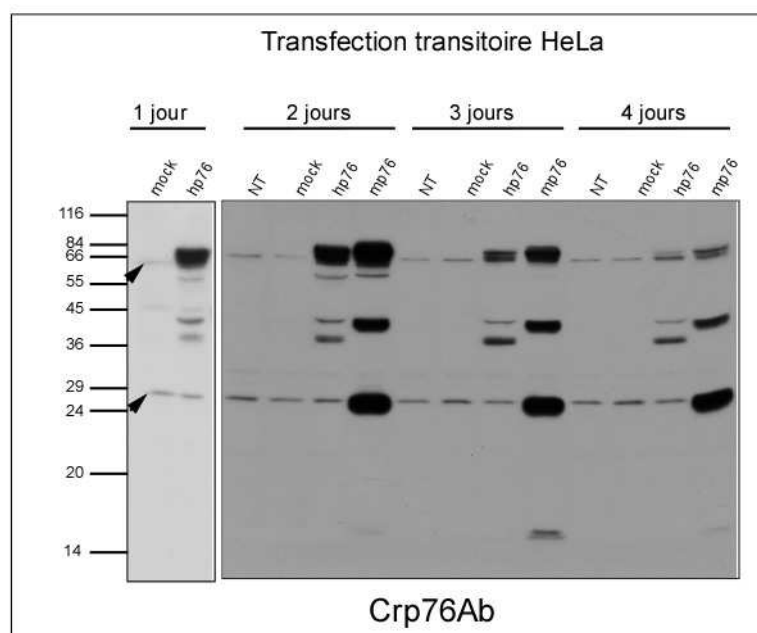
effectivement pas reconnue (Figure 36B, piste 2). La bande révélée de 50 kDa (Figure 36B, piste 4) est donc bien spécifique de hp76-myc. Sa présence dans l'éluat de l'IP ne s'explique que par son association au fragment N-terminal (32 kDa) dans le surnageant.

Une autre preuve de l'association de ces deux fragments est apportée par la purification du surnageant des cellules 293/hp76-myc sur la colonne IMAC d'ion cobalt, qui permet de retenir l'étiquette His<sub>6</sub> (cf Matériel et Méthodes, Figure 27) : les deux fragments sont retenus ensemble sur la colonne, alors que seul le fragment de 50 kDa comporte le tag myc-His<sub>6</sub>.

Pour voir si ces fragments sont liés par un ou des ponts disulfures, du surnageant de culture de cellules 293/hp76-myc non réduit (préparé dans un tampon Laemmli sans  $\beta$ -mercaptoéthanol) séparé par SDS-PAGE et analysé par Western blot avec les deux anticorps Nhp76Ab et Crp76Ab. Dans cette condition, les deux fragments issus du précurseur migrent toujours aux mêmes masses moléculaires, l'un à 32 kDa et l'autre à 50 kDa (Figure 36C). Ils ne sont donc pas liés par des ponts disulfures, car si tel était le cas, les deux anticorps détecteraient une même bande migrant à une masse moléculaire supérieure à 50 kDa. Ainsi, l'association des deux fragments de hp76-myc n'est pas de nature covalente.

#### **4. Cinétiques de l'expression de hp76 et mp76 dans des cellules transfectées transitoirement**

Des cellules HeLa en transfection transitoire ont été suivies sur 4 jours par une analyse en Western blot avec Crp76Ab. En ce qui concerne les bandes de 76 kDa correspondants aux précurseurs de hp76 et mp76, ils sont intenses pendant 2 jours puis leur intensité diminue. Les précurseurs ont presque disparu après 4 jours de transfection. Comme observé précédemment, deux fragments C-terminaux de 40 et 27 kDa sont présents pour mp76 ; de 40 et 36 kDa pour hp76 (Figure 37). L'intensité de ces fragments diminue, mais faiblement sur les 4 jours, ce qui laisse supposer qu'ils ont une durée de vie intracellulaire assez longue. Un fin doublet vers 15 kDa est également détecté dans les échantillons de mp76 qui est le plus intense à 3 jours de transfection, puis son intensité diminue après.



**Figure 37.** Suivi de l'expression transitoire de p76 en cellules HeLa sur 4 jours. Analyse par Western blot de lysats de cellules HeLa non transfectées (NT), transfectées avec le plasmide vide (« mock »), ou le plasmide codant pour hp76 ou celui codant pour mp76 ( $10^5$  cellules/piste), avec Crp76Ab, 1, 2, 3 ou 4 jours après la transfection. Les têtes de flèche désignent les bandes à 66 et 27 kDa.

Deux bandes de 66 et 27 kDa sont présentes dans les lysats de HeLa non transfectées, ou transfectées par le plasmide vide. Leur intensité reste quasiment constante sur les 4 jours (Figure 37, têtes de flèche). Ces bandes ne sont pas révélées par le sérum non immun de Crp76Ab (non montré). Cependant, comme leur intensité n'augmente pas avec la transfection, elles sont considérées comme non spécifiques.

## 5. Discussion

### 5. 1. Identification de p76

La protéine p76 a été identifiée dans notre laboratoire en 2000 à partir de lignées cellulaires humaines mais n'a pas été mentionnée dans nos publications (Journet et al., 2000; Journet et al., 2002). D'autres laboratoires l'ont identifiée au cours de 4 études protéomiques dont trois reposaient sur la purification de protéines M6P selon un protocole tout à fait similaire au nôtre.

La première étude publiée concernait l'analyse des protéines M6P de cerveau humain, purifiées par affinité sur du sCI-MPR. Soixante et une protéines ont été identifiées, dont 9 qui n'étaient pas encore caractérisées ou décrites comme lysosomales (Sleat et al., 2005) : hp76 figure parmi elles. Par la suite, ce groupe a publié une autre analyse protéomique sur du



plasma humain purifié par affinité sur du MPR (Sleat et al., 2006a). hp76 fait également partie des 148 protéines identifiées. Elle est appelée « phospholipase-like hypothetical protein LOC196463 ». La troisième étude protéomique portait sur les protéines M6P de fibroblastes embryonnaires de souris (MEF pour Mouse Embryonic Fibroblasts) déficientes pour les deux MPR (Kollmann et al., 2005). Dans ces lignées, les précurseurs des protéines M6P sont sécrétés constitutivement dans le surnageant de culture. Après purification du surnageant par affinité sur les MPR immobilisés, 42 protéines ont été identifiées, dont 38 sont lysosomales et 4 non caractérisées. Parmi elles, la « protéine hypothétique de 66.3 kDa » correspond à la p76 de souris (mp76). Enfin, une quatrième étude protéomique a été réalisée sur des granules de neuromélanine (NM) de cerveau humain purifiés par des fractionnements subcellulaires (Tribl et al., 2005). Les auteurs montrent que ces granules ont des propriétés communes avec les lysosomes et qu'ils sont probablement des organites dérivés des lysosomes (LRO). hp76 fait partie des 4 protéines identifiées de fonction inconnue.

## **5. 2. Tous les sites de N-glycosylations de hp76 sont occupés et certains portent des sucres M6P**

Le nombre de N-glycosylations de hp76 a été déterminé sur des protéines M6P de cellules U937 purifiées par affinité sur une colonne de sCI-MPR, et nous avons montré que les six sites de N-glycosylation potentielles sur la séquence de hp76 étaient effectivement occupés. L'existence d'un doublet pour le fragment C-terminal de 45 kDa s'explique par une hétérogénéité sur un des sites en position 436, 465 ou 515. Des sites glycosylés de manière hétérogène sont fréquents parmi les protéines M6P (von Figura and Hasilik, 1986). Nos résultats peuvent être comparés à une étude protéomique récente portant sur les glycopeptides porteurs de M6P des protéines de cerveau humain et de souris purifiées par affinité sur une colonne de sCI-MPR (Sleat et al., 2006b). Parmi les sites N-glycosylés porteurs de M6P identifiés pour hp76, les auteurs observent que les trois sites du fragment C-terminal sont glycosylés de manière homogène alors que leur protocole permet de détecter un site glycosylé de manière hétérogène. Cette différence est peut-être due à la source de hp76 utilisée, qui provient de protéines M6P de cerveau humain dans le cas de l'équipe de Lobel, et de protéines sécrétées par des cellules en culture dans notre cas. Le niveau d'activité des glycosyltransférases peut être différent entre un tissu et les cellules d'une lignée.

La présence de sucres M6P sur hp76 a été vérifiée par une expérience d'overlay. Une interaction directe et dépendante du M6P a été montrée entre hp76 et le CI-MPR, prouvant

que hp76 est une protéine porteuse de sucres M6P. Notre résultat est en accord avec celui du groupe de Lobel, qui identifie cinq glycopeptides porteurs de M6P pour hp76 (Sleat et al., 2006b). Cela représente un nombre assez important de N-glycosylations porteurs de M6P comparé aux autres protéines M6P lysosomales. Les 43 protéines M6P lysosomales identifiées lors de cette étude ont en moyenne 2 glycopeptides porteurs de M6P. Seulement 2 hydrolases avaient plus de 5 glycopeptides M6P : la céramidase acide (5 glycopeptides M6P) et la N-acetylglucosamine-6-sulfatase (9 glycopeptides M6P). Ce nombre important de M6P dans la protéine hp76 peut avoir des implications pour sa reconnaissance par les MPR et l'efficacité de son ciblage aux lysosomes. De plus, bien que les 6 sites de N-glycosylation de hp76 soient occupés (démonstré dans notre étude), seulement 5 d'entre eux sont porteurs de M6P (tous, sauf le site 110 de hp76 selon (Sleat et al., 2006b)). Le protocole de Sleat et al. ne détectant pas les glycopeptides porteurs de sucres complexes, il se peut que le site 110 de hp76 porte un tel sucre. Cette hétérogénéité dans les types de sucres portés par les protéines M6P lysosomales a déjà été rapportée, par exemple pour la  $\beta$ -glucuronidase et la  $\beta$ -hexosaminidase B humaines, qui ont 2 N-glycosylations avec des sucres M6P sur 4 sites effectivement N-glycosylés (Shipley et al., 1993; Sonderfeld-Fresko and Proia, 1989).

### **5. 3. p76 subit une maturation protéolytique**

#### **5. 3. 1. mp76**

Dans les protéines M6P de surnageant de cellules de souris JR11 purifiées par affinité sur une colonne de sCI-MPR, nos anticorps anti-p76 détectent un fragment de 40 kDa C-terminal. En conséquence, un fragment N-terminal de 36 kDa devrait être présent dans ces sécrétions. Notre anticorps N-terminal anti-mp76 de souris, Nmp76Ab, bien que de piètre qualité, reconnaît un doublet vers 28-30 kDa, qui pourrait être ce fragment N-terminal.

Intracellulairement, le fragment C-terminal de 40 kDa est clivé à nouveau, pour donner un fragment C-terminal de 27 kDa que l'on a nommé mp27. Ce fragment est présent dans les lysats de cellules transfectées avec le plasmide codant pour mp76, ainsi que dans les protéines M6P de cerveau de souris purifiées par affinité sur une colonne de sCI-MPR.

Dans l'étude protéomique des protéines M6P purifiées à partir du surnageant de MEF déficientes pour les deux MPR (Kollmann et al., 2005), mp76 a été identifiée sur des gels d'électrophorèse bidimensionnelle sous la forme de 17 spots à des masses moléculaires de 66, 40 et 30 kDa. Cette équipe a poursuivi l'étude de mp76 en réalisant une caractérisation similaire à celle que nous avons menée avec hp76 (Deuschl et al., 2006). Le surnageant de

culture de cellules HT 1080 (lignée humaine de fibrosarcome) transfectées avec un plasmide codant pour mp76 porteuse d'une étiquette His<sub>6</sub> C-terminale (mp76-His<sub>6</sub>) a été analysé par SDS-PAGE après purification sur une colonne IMAC d'ion nickel. Deuschl et al. détectent trois espèces majoritaires sécrétées de 75, 40 et 28 kDa, ainsi que d'autres espèces minoritaires de 66 kDa et un doublet de 15-14 kDa. Par séquençage N-terminal, ils montrent que les fragments majoritaires de 75 et 28 kDa ont le même peptide N-terminal, qui correspond à l'extrémité N-terminale de mp76 après coupure du peptide signal ; le fragment de 40 kDa est C-terminal. Avec un sérum anti-mp76 entière développé dans leur laboratoire, une analyse par Western blot des lysats de cellules qui surexpriment mp76-His<sub>6</sub> détecte des espèces intracellulaires de 75, 40, 28 et un doublet à 14-15 kDa, la plus intensément révélée étant celle de 28 kDa. Dans notre étude, nous détectons également un doublet C-terminal vers 15 kDa : il est peu intense en transfection transitoire (Figure 32, pistes 3 et 5). Il apparaît au deuxième jour de transfection et disparaît après 3 jours de transfection alors que mp27 est encore très intense (Figure 37). Ce fragment pourrait donc bien être identique à celui observé par Deuschl et al. En revanche, par analogie avec les espèces présentes dans le surnageant, les auteurs déduisent que le fragment intracellulaire de 28 kDa qu'ils observent est N-terminal. Cette interprétation est en désaccord avec la nôtre car nous avons montré que le fragment intracellulaire de 27 kDa était C-terminal. Par coïncidence, il y a un fragment de 28 kDa sécrété N-terminal et un fragment de 27 kDa intracellulaire C-terminal. D'ailleurs, nous détectons également le fragment sécrété N-terminal, mais sous forme d'un doublet de 28-30 kDa avec Nmp76Ab (cf Matériel et Méthode, Figure 25).

### 5. 3. 2. hp76

Nos résultats montrent que le précurseur de hp76 est d'abord clivé en un fragment N-terminal de 32 kDa et un doublet C-terminal de 45 kDa dans des protéines M6P humaines sécrétées. Les fragments correspondants ont été observés sur la protéine recombinante hp76-myc sécrétée. Un séquençage N-terminal sur les fragments de hp76-myc a permis d'identifier le site de clivage du peptide signal entre les résidus 41 et 42 et un site de clivage interne entre les résidus 243 et 244. Les deux fragments résultants sont associés dans le surnageant, mais ne sont pas associés par un pont disulfure. Ainsi, hp76 sécrétée serait présente sous la forme d'un précurseur monomère et d'une forme maturée hétérodimérique dont les deux chaînes restent associées par des liaisons non covalentes.

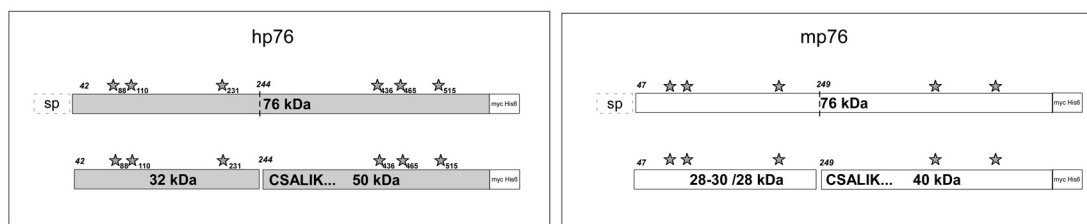
En ce qui concerne la maturation intracellulaire, l'analyse des lysats de cellules surexprimant hp76 ou hp76-myc ne nous permet pas de définir avec certitude la masse moléculaire des fragments « matures ». Elle varie selon la lignée (CHO, HeLa ou 293) : deux fragments N- et C-terminaux apparaissent, dont les masses moléculaires fluctuent respectivement entre 22 et 24 kDa pour l'un et entre 40 et 32 kDa pour l'autre, respectivement.

hp76 a été identifiée par l'équipe de Lobel parmi les protéines M6P de cerveau humain, dans 22 spots migrant entre 42-30 kDa (Sleat et al., 2005). Par un séquençage N-terminal global, le peptide VPGNKGVF de hp76 a été identifié (résidus 292-299, selon la numérotation de LOC196463), indiquant la présence d'un fragment C-terminal de hp76 mature et abondant dans le cerveau. La masse moléculaire théorique de ce fragment calculée avec le logiciel « Compute Mw/pI tool » pour la séquence des résidus 292 à 589 est de 33 kDa. En ajoutant 3 N-glycosylations (d'approximativement 1,5 kDa chacune), la masse moléculaire de ce fragment C-terminal du cerveau humain est estimée à 38 kDa. Cela pourrait concorder avec certaines masses moléculaires observées dans les lysats de cellules surexprimant hp76 ou hp76-myc.

La différence de site de coupure observée pour le fragment C-terminal de hp76 (résidu 244 ou 292) peut être due à des événements de maturation différents subis par la protéine sécrétée d'une lignée cellulaire ou par la protéine intracellulaire de cerveau. Cependant, nous avons observé d'autres fragments, certes minoritaires, dans le surnageant des cellules 293/hp76-myc, à 40 et 36 kDa. Ils sont détectés par l'anticorps Crp76Ab qui reconnaît le peptide C-terminal de hp76-myc, ce qui implique que la réduction de la masse moléculaire de 50 kDa à 36 kDa de ces fragments est due à une perte d'acides aminés du côté N-terminal, en plus de la perte de l'étiquette myc-His<sub>6</sub> (cf Figure 35). Il se peut que les acides aminés entre les résidus 243 et 292 soient coupés après un premier clivage de la chaîne C-terminale au résidu 244.

### 5. 3. 3. Comparaison des formes hp76 et mp76

Nos résultats et les données de la littérature indiquent que le premier clivage du précurseur de p76 est identique pour la forme humaine et la forme murine. En effet, Deuschl et al. ont effectué le séquençage N-terminal des fragments sécrétés de p76 de souris. Les fragments à 75 et 28 kDa sont N-terminaux ; ils débutent au résidu 47. Le fragment à 40 kDa est C-terminal ; il débute à la cystéine 249 avec la séquence « CSALIK ». Cela concorde exactement avec ce que nous avons observé pour le fragment sécrété humain de 50 kDa qui débute à la cystéine 244, également avec la séquence « CSALIK » (Figure 38).



**Figure 38. Schémas de la première étape de maturation commune à hp76 et mp76.**

**D'après nos résultats et ceux de Deuschl et al. , les précurseurs de hp76 et mp76 sécrétés sont clivés respectivement au résidu 244 et 249, donnant deux chaînes N- et C-terminales.**

Ainsi, les précurseurs humain et murin ont un premier site de clivage commun. Le fragment C-terminal de 40 kDa est « l'équivalent » murin du fragment C-terminal humain de 50 kDa de hp76. De même, le fragment N-terminal de 28 kDa (ou 28-30 kDa selon nos données sur mp76) est « l'équivalent » murin du fragment humain de 32 kDa. Par ailleurs, l'analyse par SDS-PAGE non réduit réalisée par Deuschl et al. montre également que les fragments ne sont pas associés par des ponts disulfures.

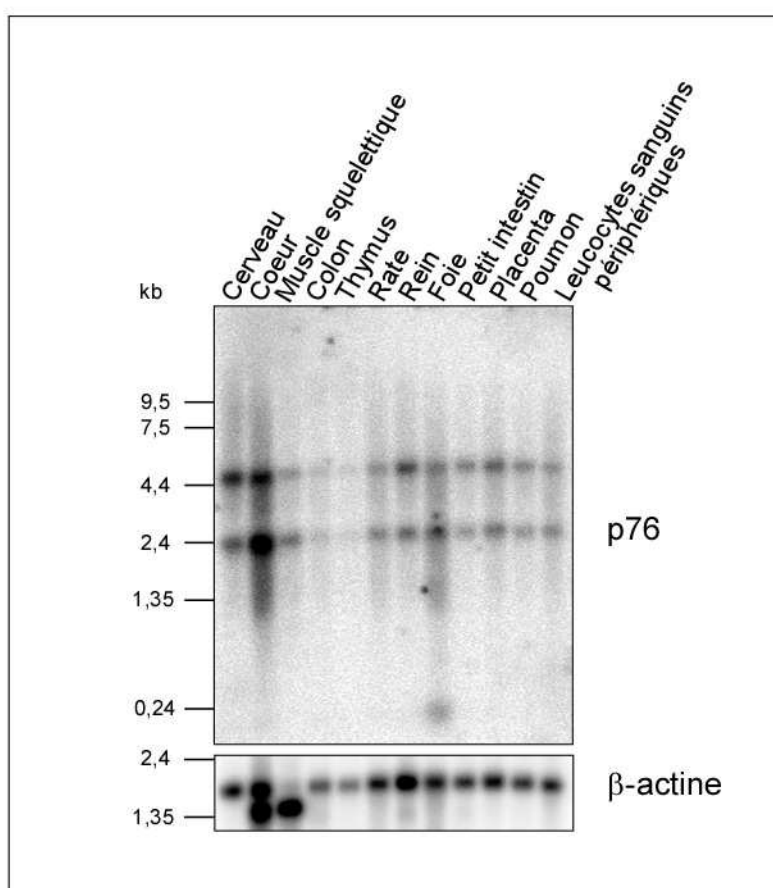
Un second clivage protéolytique a lieu dans les deux espèces. Nos données indiquent clairement l'apparition d'un fragment C-terminal de 27 kDa pour la forme murine de p76, alors qu'un tel fragment C-terminal n'est pas observé de manière aussi nette pour la forme humaine de p76. Nos lignées qui surexpriment hp76 présentent un doublet entre 40 et 32 kDa (Figure 34, Figure 37). Quant aux fragments issus de la moitié N-terminale, nos données sont peu interprétables concernant à la fois hp76 et mp76.

## II . CHAPITRE II : ETUDE DE LA LOCALISATION DE P76

La découverte de p76 au cours d'une analyse protéomique de protéines M6P purifiées par affinité sur une colonne de sCI-MPR suggère une localisation lysosomale pour p76 mais n'en est pas une démonstration. Ce chapitre relate les expériences réalisées pour montrer la distribution tissulaire de hp76 et prouver la localisation lysosomale de p76. Deux approches ont permis d'étudier la localisation de p76, l'immunofluorescence (IF) et les fractionnements subcellulaires.

### 1. Localisation tissulaire

La répartition tissulaire de hp76 a été observée au niveau des ARN messagers (ARNm) par une analyse en Northern blot, sur des tissus humains.



**Figure 39. Etude de la distribution tissulaire de hp76 par Northern blot.**

Une membrane de Northern blot contenant les ARNm extraits de 12 tissus humains a été hybridée avec une sonde spécifique de l'ADNc de hp76, radiomarquée au [ $^{32}\text{P}$ ]. Le dépôt dans chaque piste est normalisé avec le signal de la sonde de  $\beta$ -actine.

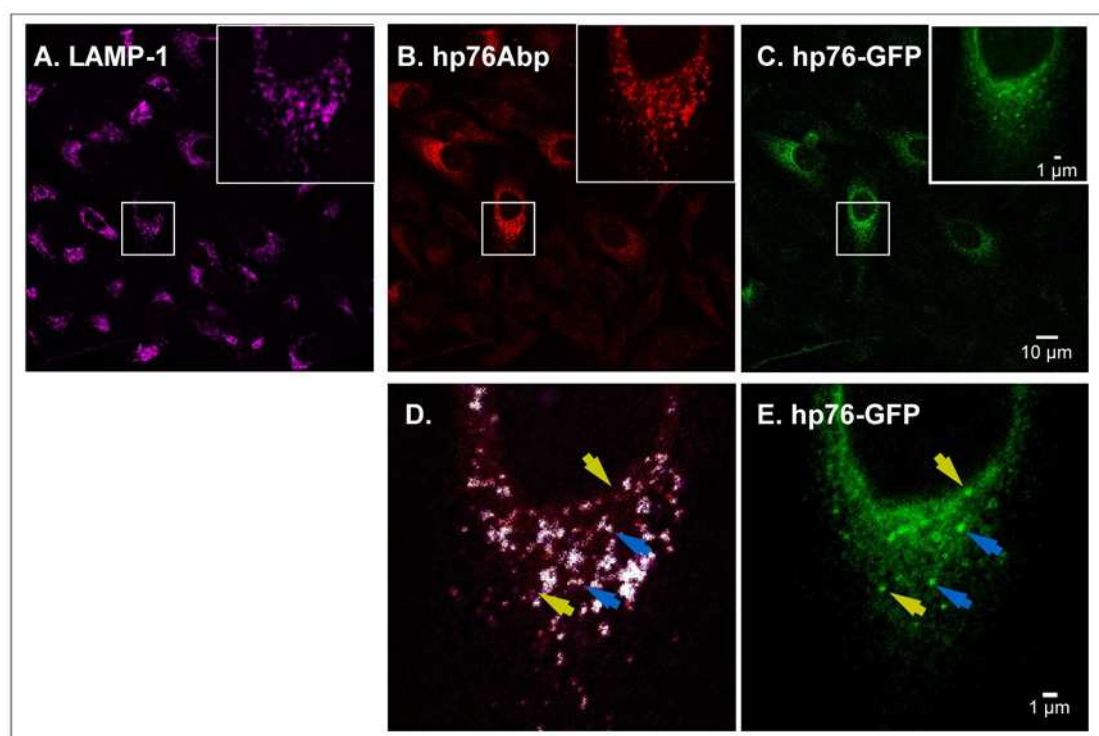
Un transcrit de 2,4 kb est détecté dans tous les tissus (Figure 39) en accord avec la taille attendue pour l'ARNm de hp76 (2584 pb). La quantification du signal radioactif de hp76 normalisé par celui de l'actine indique une expression un peu plus importante dans le cœur, le cerveau et le foie. On observe également la présence d'un transcrit de 4,4 kb, dont l'expression suit celle du transcrit de 2,4 kb et d'un transcrit de 0,24 kb dans le foie (Figure 39). Le transcrit de 0,24 kb pourrait être dû à une dégradation de l'ARN messager.

## 2. Localisation intracellulaire

### 2. 1. Localisation de p76 par immunofluorescence

#### 2. 1. 1. Expression de protéines chimères hp76-GFP ou hp76-myc

La localisation intracellulaire de hp76 a initialement été étudiée dans les lignées HeLa stables HeLa/hp76-GFP (Figure 40) ou HeLa/hp76-myc (Figure 41).



**Figure 40. Analyse en immunofluorescence des cellules HeLa/ hp76-GFP.**

Les cellules sont fixées et marquées par un double marquage avec un anticorps anti-LAMP-1 (A, Cy-5) et avec l'anticorps polyclonal purifié hp76Abp (B, Cy-3). hp76-GFP est également détectée par la fluorescence de la GFP (C). Les vésicules ayant un marquage commun LAMP-1 et hp76Abp sont marquées en blanc (D). Les flèches bleues désignent les vésicules ayant les trois marquages LAMP-1, hp76Abp et GFP, les flèches jaunes montrent des vésicules intensément marquées par la GFP, mais pas ou peu par LAMP-1 et hp76Abp (E).

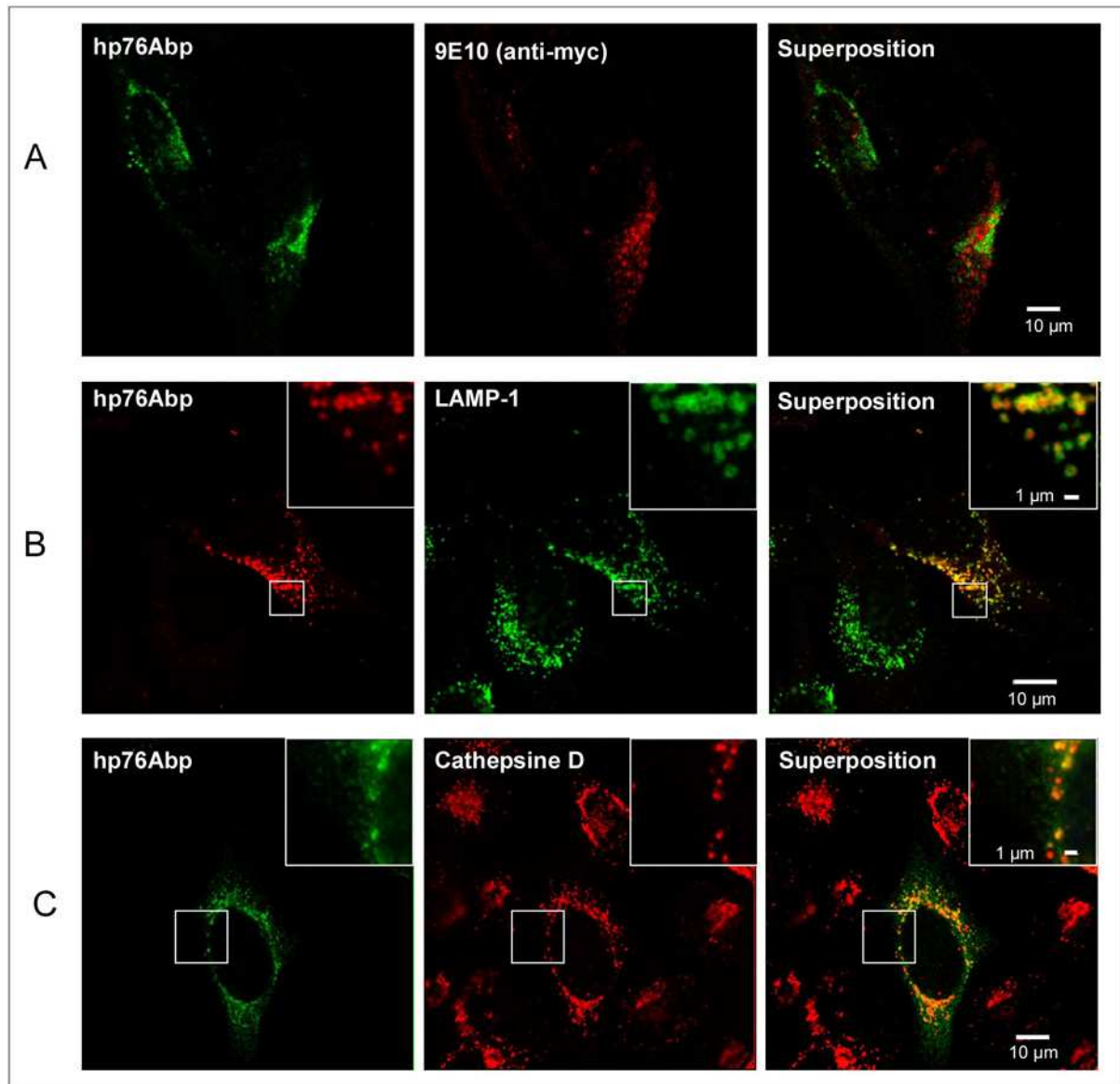
Le marquage de hp76 par la fluorescence intrinsèque de la GFP dans la chimère est bien vésiculaire (Figure 40C) mais il ne colocalise que partiellement avec les lysosomes, repérés par le marquage LAMP-1 (Figure 40A).

Ainsi, nous avons utilisé l'anticorps hp76Ab purifié (hp76Abp) : son marquage dans les cellules concorde bien avec celui des cellules surexprimant hp76-GFP ; il est absent des cellules non transfectées (Figure 40B). Ceci illustre par ailleurs le fait que hp76 endogène est trop peu abondante dans les cellules non transfectées pour être détectée avec l'anticorps hp76Ab. De nombreuses vésicules sont marquées par hp76Abp, qui colocalisent très majoritairement avec le marquage LAMP-1 (Figure 40D). Par une observation plus précise, on voit qu'il y a peu de vésicules ayant le triple marquage GFP, hp76Abp et LAMP-1 (Figure 40E) et que les vésicules marquées par la GFP ne sont pas ou peu marquées par hp76Abp et LAMP-1.

Une observation similaire a été faite sur les lignées stables HeLa/hp76-myc. Le marquage de l'étiquette myc avec l'anticorps 9E10 est vésiculaire, mais la localisation de ces vésicules est clairement différente des vésicules marquées par l'anticorps hp76Abp (Figure 41A). En revanche, les vésicules marquées par l'anticorps hp76Abp colocalisent majoritairement avec le marquage LAMP-1 (Figure 41B) ou cathepsine D (Figure 41C).

Il se peut que les étiquettes GFP ou myc-His<sub>6</sub> de hp76 soient dégradées par les protéases acides dans la voie endocytaire avant d'atteindre les lysosomes. Ainsi, comme hp76 est très concentrée dans les lysosomes, elle est convenablement détectée par l'anticorps hp76Abp. En amont dans la voie endocytaire, la plus faible concentration en hp76 (avec son étiquette intacte) ne permet plus sa détection par ce même anticorps. En revanche, cette concentration en hp76 est suffisante pour une détection avec l'anticorps anti-myc, le 9E10. Cet anticorps doit être plus affiné pour l'épitope myc que l'anticorps hp76Abp pour la protéine hp76.

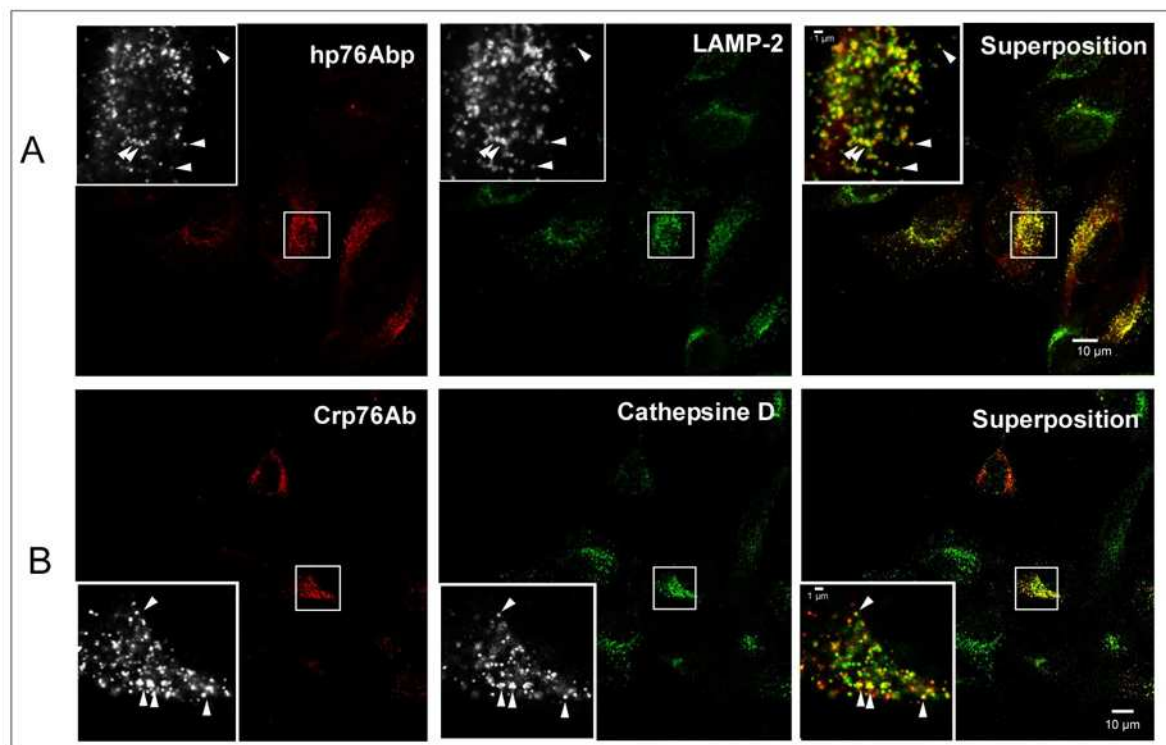




**Figure 41. Analyse en immunofluorescence de la lignée stable HeLa/ hp76-myc.**  
 Les cellules HeLa exprimant de manière stable hp76-myc sont fixées et marquées avec l'anticorps hp76Ab purifié (A et C, Alexa 488 ; B, Cy-3) et avec des anticorps anti-myc (Cy-3), anti-LAMP-1 (Alexa 488) ou anti-Cathepsine D (Cy-3).

## 2. 1. 2. Expression de hp76 (sans étiquette)

Afin de vérifier que l'étiquette accolée à hp76 ne provoque pas un ciblage artefactuel de hp76 au lysosome, des cellules HeLa ont été transfectées de manière transitoire avec un plasmide pcDNA3.1/hp76 (codant pour hp76 sans étiquette) et observées 4 jours après. Nous avons regardé la localisation intracellulaire de hp76 avec l'anticorps hp76Abp (Figure 42A) et l'anticorps Crp76Ab (Figure 42B). Les vésicules contenant hp76 colocalisent de manière extensive avec les marqueurs des lysosomes LAMP-2 (Figure 42A) et la cathepsine D (Figure 42B).

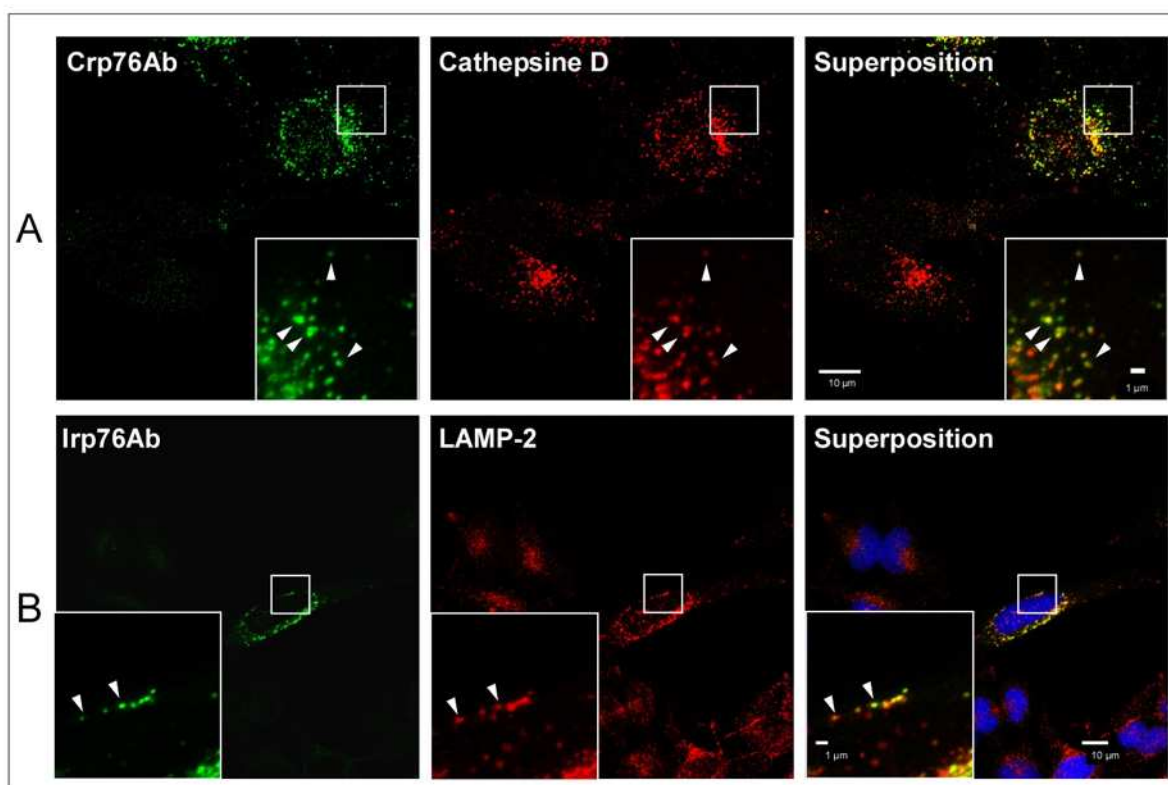


**Figure 42. Analyse en immunofluorescence de cellules HeLa TT hp76.**

Les cellules HeLa ont été transfectées de manière transitoire (TT) avec le plasmide pcDNA3.1/hp76 codant pour hp76, puis fixées 4 jours après. Le marquage de hp76 est visualisé par les anticorps hp76Abp (A) ou Crp76Ab (B). Les lysosomes sont marqués par un anticorps anti-LAMP-2 (A) ou par un anticorps anti-cathepsine D (B). Les flèches désignent des vésicules qui colocalisent.

### 2. 1. 3. Expression de mp76 (sans étiquette)

La localisation intracellulaire de la p76 de souris (mp76) a également été vérifiée sur des cellules HeLa transfectées avec le plasmide pCMV-SPORT6/mp76 et immuno-marquées 4 jours après la transfection. La majorité des vésicules marquées par les anticorps anti-mp76 Crp76Ab (Figure 43A) et Irp76Ab (Figure 43B) colocalise avec les lysosomes, repérés avec les marqueurs habituels, la cathepsine D (Figure 43A) et LAMP-2 (Figure 43B).



**Figure 43. Analyse en immunofluorescence de cellules HeLa/ mp76.**

Des cellules HeLa ont été transfectées avec le plasmide pCMV-SPORT6/mp76 codant pour mp76, puis fixées 4 jours après. Le marquage de mp76 est visualisé par nos anticorps polyclonaux, Crp76Ab (A) ou Irp76Ab (B). Les lysosomes sont marqués par un anticorps anti-cathepsine D (A) ou par un anticorps anti-LAMP-2 (B). Les flèches désignent des vésicules qui colocalisent.

#### 2. 1. 4. Conclusions sur l'approche par immunofluorescence

Par cette approche, nous avons observé que la plupart des vésicules marquées p76 colocalisent avec des marqueurs des lysosomes. D'après les épitopes ciblés par les anticorps utilisés, il apparaît qu'au moins un fragment C-terminal dérivé de la forme murine de p76 est présent dans les lysosomes, tandis que pour la forme humaine de p76, des fragments N- et C-terminaux sont détectés dans les lysosomes.

Ces expériences ont été réalisées sur des cellules qui surexpriment p76. Nos anticorps anti-p76 ne détectent pas hp76 endogène dans les cellules HeLa non transfectées. hp76 est pourtant exprimée dans ce type cellulaire : après purification par affinité sur une colonne de sCI-MPR d'un surnageant de culture de cellules HeLa dont la sécrétion des précurseurs de protéines néosynthétisées a été provoquée par ajout de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , le précurseur à 76 kDa et la bande à 32 kDa sont détectées en Western blot avec hp76Ab dans (non montré).

Les anticorps Nmp76Ab et Nhp76Ab purifiés ont été utilisés sur des cellules HeLa surexprimant respectivement mp76 et hp76 (testés respectivement deux et une fois), en

parallèle des marquages faits avec les autres anticorps. Aucun de ces anticorps ne donne un marquage remarquable.

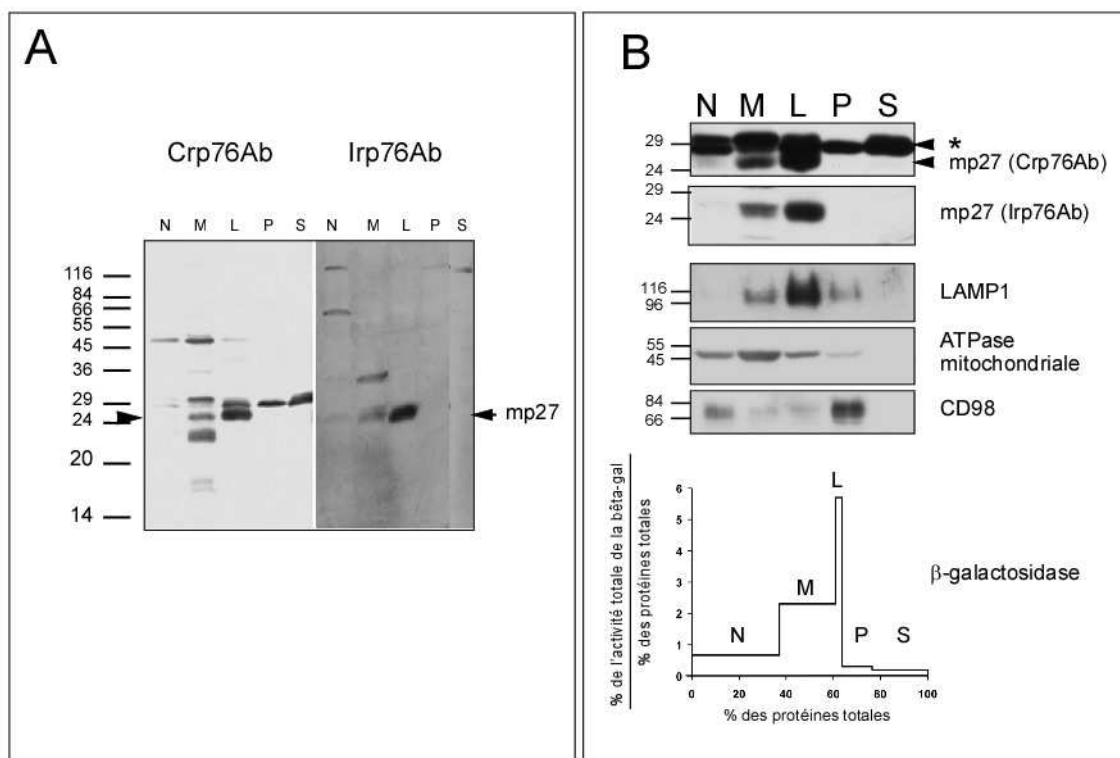
## **2. 2. Localisation de mp76 par fractionnements subcellulaires**

L'étude de la localisation intracellulaire d'une protéine peut également être réalisée par une approche biochimique qui consiste à séparer les différents organites intracellulaires intacts par des centrifugations successives. Cette technique a été mise au point à partir de foies de souris « frais », homogénéisés (Beaufay et al., 1964; de Duve et al., 1955). Les échantillons ont été préparés dans le cadre d'une collaboration avec le laboratoire du Pr Jadot, à Namur, en Belgique, et nous ont permis d'analyser le comportement de la p76 endogène de souris.

### **2. 2. 1. Distribution de mp76 dans un fractionnement subcellulaire total**

A l'issue d'un fractionnement subcellulaire total, réalisé par centrifugations différentielles, l'homogénat de foie est fractionné en fractions nucléaire (N), mitochondriale lourde (M), mitochondriale légère et lysosomale (L), peroxisomale et microsomale (P), et cytoplasmique (S). La distribution de mp76 dans ces fractions a été étudiée par Western blot avec les trois anticorps Crp76Ab, Irp76Ab et Nmp76Ab. La Figure 44A montre les images classiquement obtenues (expériences ont été reproduites plusieurs fois, sur des fractionnements différents).

Les anticorps anti-p76 reconnaissent plusieurs bandes dans ces échantillons complexes. Cependant, un seul fragment est révélé par les deux anticorps dirigés contre l'extrémité C-terminale de mp76 : il s'agit du fragment à 27 kDa, appelé mp27, qui a déjà été observé dans différents échantillons et qui est issu de la maturation protéolytique de mp76 (cf paragraphe 3. 1 et Figure 33). On remarque qu'il est particulièrement enrichi dans la fraction L et également, de manière moindre, dans la fraction M. Cette distribution correspond tout à fait à celle de protéines lysosomales comme LAMP-1 ou la  $\beta$ -galactosidase (Figure 44B). La distribution de marqueurs d'autres compartiments est différente et en adéquation avec les données de la littérature : l'ATPase mitochondriale est la plus enrichie dans la fraction M, mais elle est également présente dans les fractions N et L. Le marqueur de la membrane plasmique CD98 est distribué dans les fractions N et P (Figure 44B).



**Figure 44. Distribution de mp76 dans un fractionnement subcellulaire total, réalisé par centrifugation différentielle.**

(A) Analyse par Western blot des échantillons du fractionnement subcellulaire de foie de souris (N : fraction nucléaire, M : mitochondriale lourde, L : mitochondriale légère et lysosomale, P : peroxisomale et microsomale et S : cytoplasmique). Une même quantité de protéine est déposée dans chaque piste (40 µg) d'un gel à 12% de polyacrylamide. Ces images entières montrent le profil classiquement obtenu avec les anticorps Crp76AB et Irp76Ab. (B) Distribution dans un fractionnement subcellulaire total de différents marqueurs analysée par Western blot (mp27, LAMP-1 lysosomale, APTase mitochondriale et CD98 de la membrane plasmique) ou par dosage enzymatique (β-galactosidase lysosomale). Les protéines sont ici séparées sur un gel à 10% de polyacrylamide. L'astérisque désigne une bande non spécifique révélée par Crp76Ab.

En ce qui concerne l'analyse par Western blot de ces mêmes fractions avec l'anticorps Nmp76Ab, dirigé contre l'extrémité N-terminale de mp76, de nombreuses espèces sont révélées. Cet anticorps a été purifié sur le peptide utilisé pour l'immunisation, mais le résultat du Western blot n'en est pas amélioré (cf Matériel et Méthodes, Figure 25). Pour trouver les fragments spécifiques de Nmp76ab parmi ces nombreuses bandes, une expérience de déplacement avec le peptide immunogène a été réalisée. Il apparaît clairement que cet anticorps manque de spécificité.

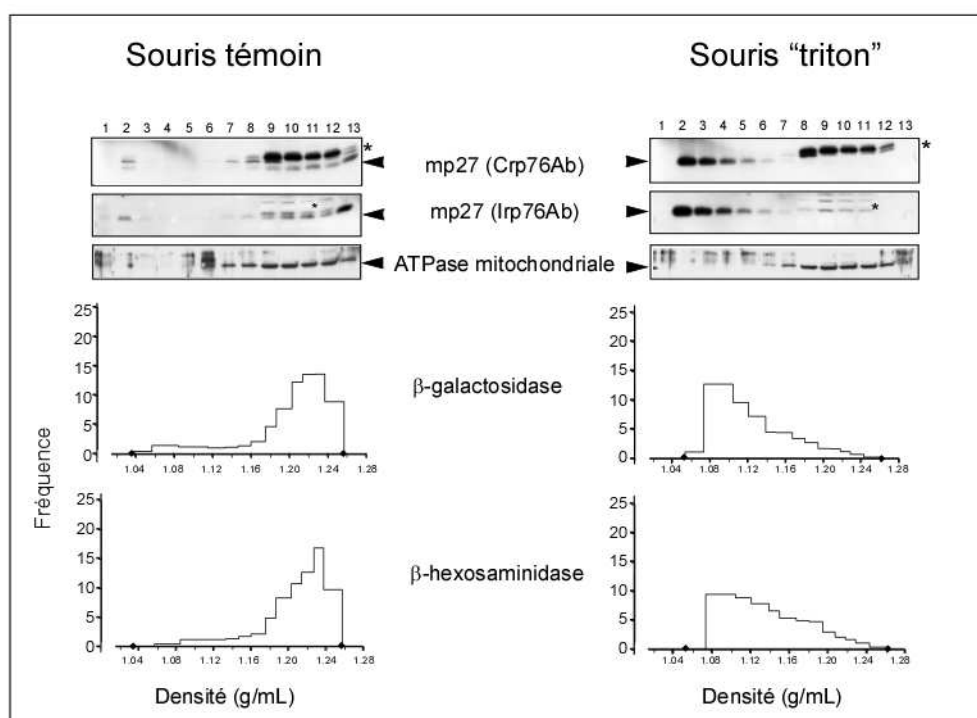
### 2. 2. 2. Distribution de mp76 dans des gradients de densité

La démonstration classique de la localisation d'une protéine dans les lysosomes consiste ensuite à étudier sa distribution dans des gradients de densité réalisés sur une fraction « ML »

préparée à partir de foie de souris. La réunion de ces deux fractions M et L est utilisée car ce sont elles qui contiennent mp27. La fraction ML est préparée de manière similaire à un fractionnement subcellulaire, par des centrifugations différentielles : le surnageant post-nucléaire de l'homogénat de foie est centrifugé à la vitesse de sédimentation de la fraction L (la plus élevée entre M et L). Le culot correspond alors directement à l'ensemble des organites qui sédimentent dans les fractions M et L. Pour démontrer la localisation lysosomale d'une protéine, il s'agit de comparer la distribution de cette protéine dans des gradients de densité réalisés entre une fraction ML préparée à partir de foie de souris normale et une fraction ML préparée à partir de foie de souris ayant reçu une injection de Triton WR-1339. Ce détergent est non hémolytique et il est éliminé du sang en 4 jours, en s'accumulant dans les lysosomes du foie. Ces lysosomes sont alors appelés « tritosomes ». Cette accumulation de Triton WR-1339 provoque une diminution spectaculaire de la densité des lysosomes, observable sur un gradient de densité (Wattiaux and Wattiaux-de Coninck, 1967). Les fractions ML issues d'une souris normale et d'une souris injectée au Triton WR-1339 sont donc déposées chacune au sommet d'un gradient linéaire de saccharose et soumises à une centrifugation isopycnique au cours de laquelle les organites vont sédimenter à leur densité d'équilibre. Le dosage de l'activité des hydrolases lysosomales des différentes fractions rend compte de la distribution des lysosomes. Puis, les fractions sont analysées par Western blot pour connaître la distribution de mp76.

#### 2 . 2 . 2 . 1 Cas du fragment C-terminal mp27

Dans les échantillons de souris normale, le fragment mp27 se trouve dans les fractions lourdes du gradient. Sa distribution est identique à celle des lysosomes, déterminée par les activités enzymatiques des  $\beta$ -galactosidase et  $\beta$ -hexosaminidase (Figure 45, partie gauche). Dans les échantillons de la souris injectée au Triton WR-1339, mp27 est présente dans des fractions beaucoup plus légères, qui contiennent aussi les marqueurs des lysosomes (Figure 45, partie droite). Les mitochondries sédimenteront dans des fractions proches de celles contenant les lysosomes dans une souris normale (Beaufay et al., 1964), mais leur densité n'est pas affectée par le Triton WR-1339, comme le montre l'analyse par Western blot par un anticorps anti-ATPase mitochondriale (Figure 45).



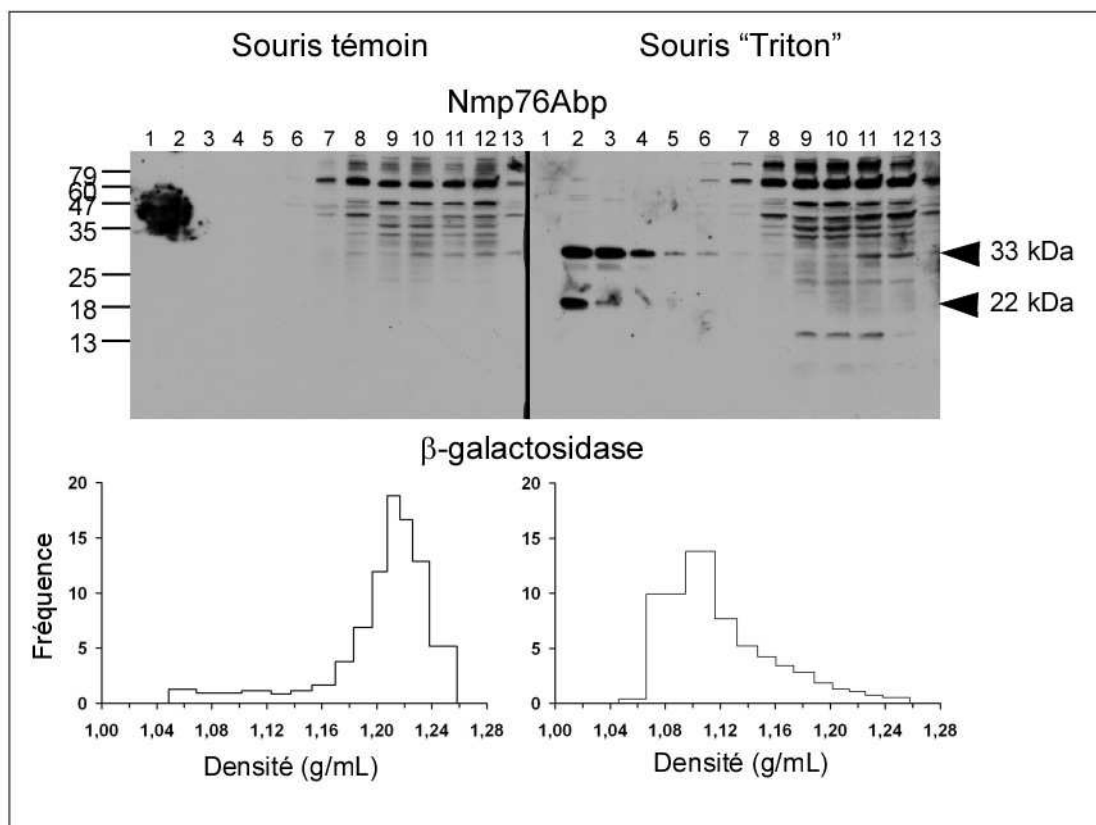
**Figure 45.** Distribution de mp27 dans des gradients de densité, analysée par Western blot par Crp76Ab et Irp76Ab.

Une fraction ML issue d'une souris témoin (partie gauche) ou d'une souris ayant reçu une injection de Triton WR-1339 (partie droite) est séparée sur un gradient de saccharose de densité continue (1,04-1,26 g/mL). Les distributions de mp27 et de l'ATPase mitochondriale sont analysées par Western blot, celles des β-galactosidase et β-hexosaminidase sont analysées par dosage enzymatique. La densité de chaque fraction du gradient (numérotées de 1 à 13) a été mesurée. Ainsi, la différence de densité d'une fraction à l'autre ( $\Delta\rho$ ) est proportionnelle à la largeur des histogrammes (graphes). La fréquence représente l'activité mesurée dans chaque fraction, divisée par  $\Delta\rho$ . Les astérisques désignent des bandes non spécifiques.

#### 2 . 2 . 2 . 2 Cas des fragments N-terminaux de mp76

Les fractions des gradients de densité issus de souris normale ou traitée au Triton WR-1339 ont également été analysées avec l'anticorps Nmp76Ab, dirigé contre l'extrémité N-terminale de mp76. Dans les échantillons de souris témoin, aucun signal ne semble correspondre à mp76, si ce n'est un fragment dont la taille pourrait être de 76 kDa, dans les fractions lourdes 7 à 13. Dans les échantillons de la souris injectée au Triton WR-1339, ce fragment se trouve également dans les fractions lourdes 7 à 13. Il n'est pas déplacé, témoignant de son absence dans les lysosomes.

En revanche, deux polypeptides apparaissent très nettement dans la souris traitée au Triton WR-1339 à 33 et 22 kDa dans les fractions légères 2 à 6 qui sont celles où les tritosomes s'équilibrent (Figure 46).



**Figure 46. Distribution de mp76 dans des gradients de densité, analysée par Western blot par Nmp76Ab.** Fraction ML issue d'une souris témoin (partie gauche) ou d'une souris ayant reçu une injection de Triton WR-1339 (partie droite) séparée sur un gradient de densité de saccharose (1,04-1,26 g/mL). Les fractions ont été séparées par électrophorèse puis analysées par Western blot et incubées avec l'anticorps N-terminal Nmp76Ab purifié. Le dosage de la  $\beta$ -galactosidase dans les fractions des gradients témoigne de la distribution des lysosomes.

Cependant, ces deux fragments ne sont détectables dans aucune des fractions du gradient de densité réalisé à partir de la fraction ML de foie de souris normale.

Dans un fractionnement subcellulaire total obtenu par des centrifugations différentielles, il y a bien des espèces à ces masses moléculaires qui pourraient correspondre à ces polypeptides (cf Matériel et Méthodes, Figure 25) mais l'affirmer est impossible, car trop d'espèces protéiques sont reconnues par l'anticorps, même purifié.

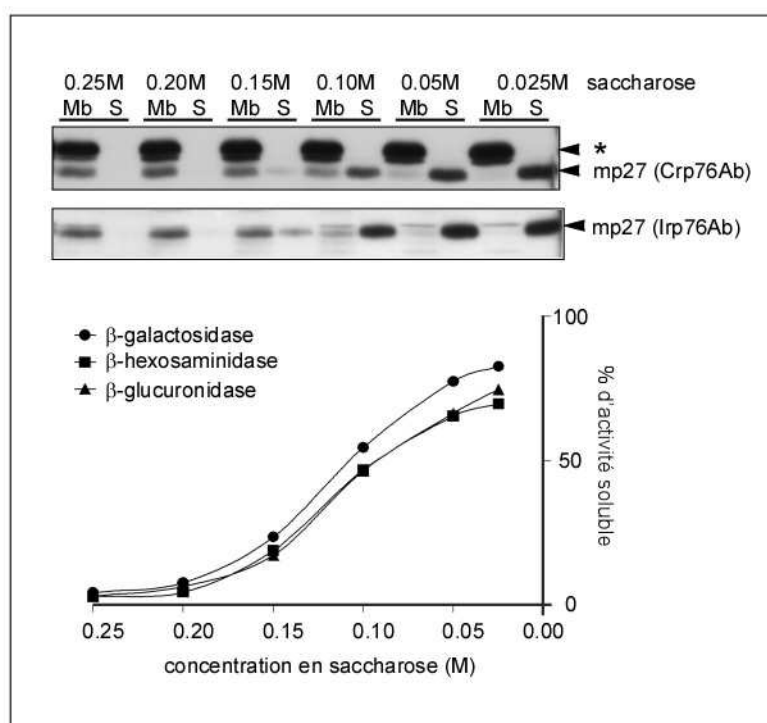
### 2. 2. 3. Latence

#### 2 . 2 . 3 . 1 Le fragment C-terminal mp27 est latent

Le matériel soluble des lysosomes, du fait qu'il est enfermé dans une vésicule, présente la propriété de latence : il ne devient détectable dans le milieu environnant que lorsque la



membrane lysosomale est altérée par exemple sous l'effet de cycles de congélation-décongélation ou d'un choc osmotique.



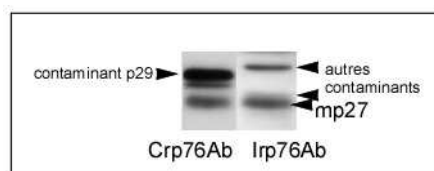
**Figure 47. Latence de mp27.**

Des fractions ML de souris normale sont soumises à des chocs osmotiques de force croissante. Après ultracentrifugation, les surnageants (S) et culots membranaires (Mb) ont été analysés par Western blot (avec Crp76Ab et Irp76Ab). Les activités enzymatiques lysosomales ont été dosées dans ces échantillons (graphe). Les activités sont représentées en % de l'activité soluble, soit (activité mesurée dans S)/(somme des activités S+ Mb) x 100.

Des aliquots d'une même fraction ML de foie de souris normale sont soumis à des chocs osmotiques de force croissante. Le surnageant et les membranes sont séparés par ultracentrifugation et ces deux fractions sont analysées soit par Western blot pour suivre la distribution de mp76, soit par des dosages enzymatiques pour suivre des marqueurs lysosomaux solubles, la  $\beta$ -galactosidase, la  $\beta$ -hexosaminidase et la  $\beta$ -glucuronidase (Figure 47). En conditions iso-osmotiques à 0,25 M de saccharose, mp27 est présent uniquement dans la fraction membranaire : il est piégé dans les lysosomes ; il sédimente donc avec les membranes. Plus la solution devient hypotonique, plus le signal de mp27 devient intense dans la fraction soluble et disparaît de la fraction membranaire. La libération progressive de mp27 dans le surnageant est tout à fait comparable à celle des hydrolases lysosomales. Ce résultat montre à nouveau que le comportement du fragment C-terminal mp27 est identique à celui des hydrolases lysosomales.

### 2 . 2 . 3 . 2 Analyse de la bande contaminante à 29 kDa

Une bande contaminante à 29 kDa assez intense (astérisque dans les Figure 44, 45 et 47) est présente dans les analyses par Western blot avec Crp76Ab. Cette bande est considérée comme non spécifique de mp76 car (1) elle n'est pas révélée par l'autre anticorps C-terminal Irp76Ab (Figure 48) et (2) cette bande n'est pas observée dans des lysats de HeLa surexprimant mp76 (Figure 37).



**Figure 48. Analyse par Western blot de la bande contaminante à 29 kDa.**

**Zoom sur une membrane de Western blot ayant été incubée d'abord avec Irp76Ab (à droite), puis séchée et ré-incubée avec Crp76Ab. Les bandes autres que m27 révélées par Irp76Ab sont différentes de celles révélées par Crp76Ab. L'échantillon est celui de la Figure 47, « 0,2M, Mb ».**

Par ailleurs, dans les conditions de l'expérience de choc osmotique (Figure 47), cette espèce reste membranaire.

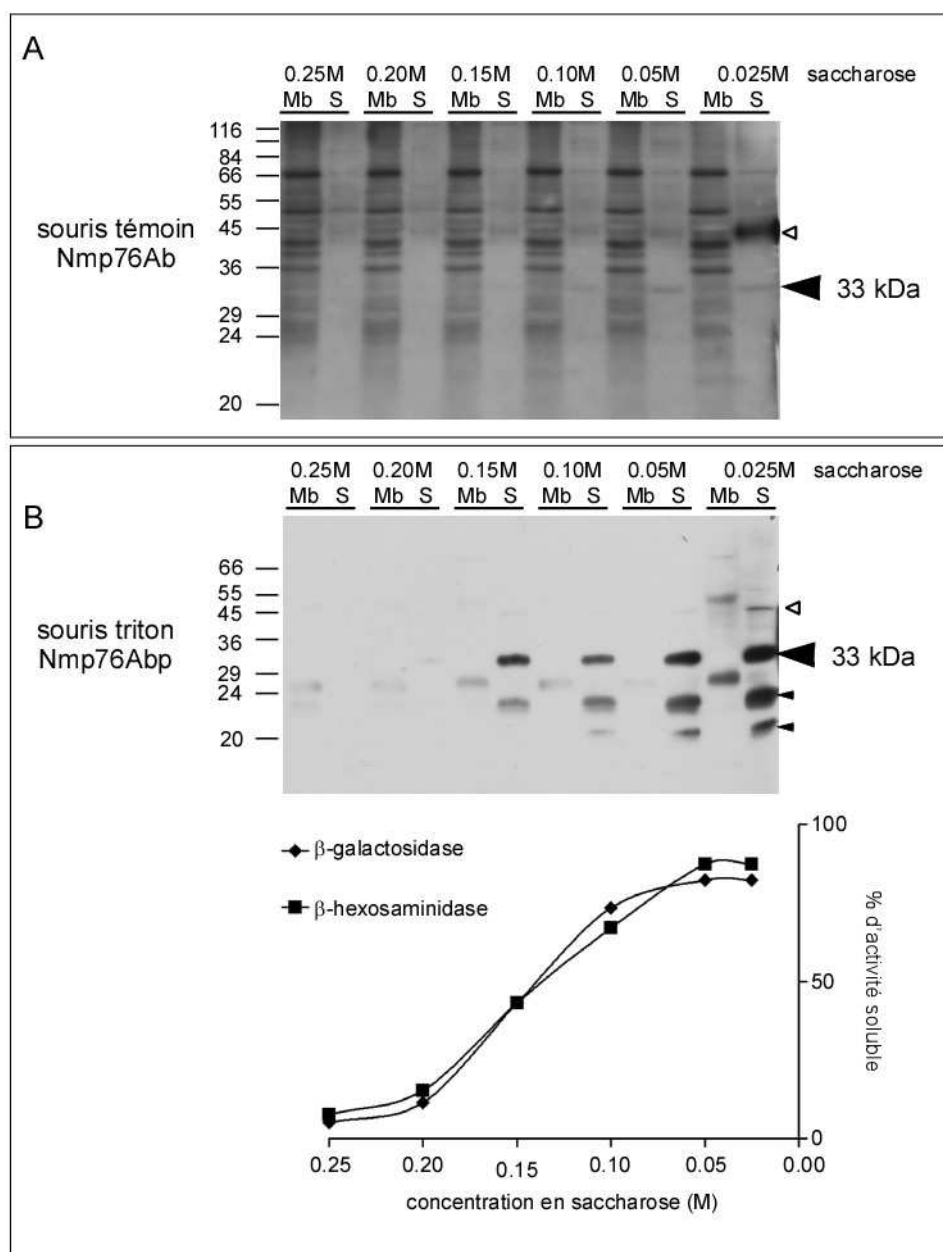
Une analyse en spectrométrie de masse en LC-MS/MS a été réalisée dans le but de confirmer que cette bande à 29 kDa ne contenait pas mp76. Pour cela, un gel SDS-PAGE a été réalisé avec sur une piste, un échantillon « Mb, 0,025 M de saccharose » de l'échantillon de choc osmotique (cf Figure 47), qui est déplété en mp27 et riche en p29. Sur l'autre piste, un échantillon « S, 0,025 M de saccharose » de l'échantillon de choc osmotique a été déposé, qui est à l'inverse enrichi en mp27 et semble dépourvu de p29. Une bande de gel qui recouvre les masses moléculaires 27 et 29 kDa a été découpée dans chaque piste. Dans la bande « Mb », enrichie en p29, plus de 50 protéines principalement mitochondriales ont été identifiées. Aucun peptide de mp76 n'a été trouvé. L'analyse de la bande « S », enrichie en mp27, a identifié un peptide de mp76 (DQSLVEDMDAMVR, résidus 470-482) parmi plus de 20 protéines, lysosomales et mitochondriales. Bien que cette analyse n'apporte pas la preuve définitive de l'absence de mp27 dans l'échantillon « Mb » à 29 kDa, les données s'accordent bien avec notre hypothèse que ce fragment p29 n'est pas une forme particulière de mp76, mais un contaminant.

### 2 . 2 . 3 . 3 Analyse des fragments N-terminaux de mp76

Les échantillons de fraction ML de souris témoin soumis aux chocs osmotiques ont été analysés avec Nmp76Ab. A nouveau, cet anticorps détecte de nombreuses espèces,

principalement dans la fraction membranaire et qui ne sont pas latentes. Seule une fine bande vers 33 kDa apparaît progressivement dans les fractions solubles de force croissante (Figure 49A, grande flèche noire), mais elle n'est pas visible nettement dans les fractions membranaires. Une bande à 45 kDa apparaît également, très intense dans la fraction du choc osmotique le plus fort (S, 0,025M), mais son intensité semble constante dans les autres fractions solubles (Figure 49A, flèche vide).

La même expérience de choc osmotique a été réalisée, mais à partir d'une fraction ML d'une souris injectée au Triton WR-1339. Dans ce cas, la bande à 45 kDa est à nouveau détectée uniquement dans la fraction soluble « S, 0,025M » (Figure 49B, flèche vide). Quant à la bande à 33 kDa, elle apparaît plus nettement (aussi du fait que Nmp76Ab est purifié dans cette analyse) (Figure 49B, grande flèche noire). Deux autres bandes apparaissent, à 24 et 21 kDa (Figure 49B, petites flèches noires). On ne sait pas laquelle correspond à la bande observée à 22 kDa dans le gradient de densité de la souris traitée au Triton WR-1339 (Figure 46) car les marqueurs de masse moléculaire ne sont pas les mêmes pour ces deux analyses. L'intensité de ces trois bandes dans les fractions solubles augmente avec l'hypotonie du milieu. Cependant, elles sont toutes les trois totalement invisibles dans les fractions membranaires (Figure 49B). Pour affirmer que ce sont des fragments lysosomaux latents, il faudrait les voir progressivement passer de la fraction membranaire à la fraction soluble, comme c'est le cas pour mp27 (Figure 47). Une fois de plus, on ne peut pas affirmer que ces fragments N-terminaux de mp76 ont un comportement identique à celui des protéines lysosomales solubles.



**Figure 49. Latence de mp76 observée avec l'anticorps Nmp76Ab.**

(A) Fraction ML de souris normale (mêmes échantillons que Figure 47), analysés avec Nmp76Ab.

(B) Fraction ML de souris ayant reçu une injection de Triton WR-1339 soumise à des chocs osmotiques de force croissante. Après ultracentrifugation, les surnageants (S) et culots membranaires (Mb) ont été analysés par Western blot avec Nmp76Ab purifié (Nmp76Abp). Les activités enzymatiques lysosomales ont été dosées dans ces échantillons (graphe). Les activités sont représentées en % de l'activité soluble, soit (activité mesurée dans S)/(somme des activités S+ Mb) x 100.

Ainsi, l'anticorps Nmp76Ab ne parvient à détecter correctement les fragments « spécifiques » de mp76 (en particulier le fragment à 33 kDa) que dans les fractions légères d'un gradient de densité ou dans les fractions solubles d'une fraction ML soumise à un choc osmotique. Ces échantillons ont en commun d'être issus de souris traitées au Triton WR-1339. Mais leur autre point commun est que ces échantillons sont pauvres en protéines et peu complexes, en

comparaison avec les fractions lourdes des gradients de densité ou les fractions membranaires après un choc osmotique. Les hypothèses pour expliquer cette absence de détection du fragment de 33 kDa dans les échantillons préparés à partir de souris normale sont soit (1) que ce fragment apparaît du fait de l'injection de Triton WR-1339, qui provoque des bouleversements métaboliques (Borensztajn et al., 1976; Frantz and Hinkelman, 1955; Otway and Robinson, 1967), soit (2) qu'il est « masqué » dès qu'il est présent dans des échantillons complexes. Pour tester la première hypothèse, une analyse en Western blot a été réalisée pour comparer une fraction ML préparée à partir d'une souris normale avec celle préparée à partir d'une souris injectées au Triton WR-1339 (non montré). On ne visualise pas de fragment plus particulièrement intense dans la fraction ML préparée à partir d'une souris injectées au Triton WR-1339. Ainsi, la seconde hypothèse semble la plus probable, d'autant que l'anticorps Nmp76Ab n'est pas très spécifique de mp76. On peut supposer que ce sont les nombreux composés protéiques et lipidiques qui masquent mp76.

### **3. Discussion**

#### **3. 1. p76 est ubiquitaire**

Le taux d'expression de l'ARNm de hp76 est similaire dans les différents organes, ce qui suggère une expression ubiquitaire de p76 dans tous les tissus. Sur le site internet SymAtlas, qui centralise des données d'analyses transcriptomiques, la répartition tissulaire de l'ARNm de hp76 apparaît également ubiquitaire. Cette répartition est fréquente pour certaines protéines lysosomales, comme par exemple la cathepsine C (Pham et al., 1997), la cathepsine O (Velasco et al., 1994), la DNase II (Yasuda et al., 1998), la phosphatase acide (Geier et al., 1992), etc. Deux transcrits à 4,4 et 2,4 kb sont détectés dans notre expérience de Northern blot. Nous n'avons pas confirmé ce résultat avec une deuxième sonde spécifique de hp76 indépendante de la première. Ainsi, des lavages trop peu stringents pourraient expliquer la présence de ces deux ARNm (dont le plus grand pourrait ne pas être spécifique de hp76). Cependant, dans l'étude de la distribution tissulaire de mp76 réalisée par Deuschl et al. par Northern blot, trois transcrits sont également détectés entre 2 et 5 kb, dans tous les tissus testés (Deuschl et al., 2006). Les auteurs obtiennent le même résultat avec deux sondes, l'une qui couvre toute la séquence codante et l'autre qui couvre l'extrémité 3' non codante. Il semble ainsi probable qu'au moins deux transcrits de p76 existent, chez l'homme et la souris. Par ailleurs, plusieurs variants de transcrits codant pour des protéines lysosomales sont

également fréquemment détectés (Boonen et al., 2006; Geier et al., 1992). L'origine de ces différents transcrits peut s'expliquer par un épissage alternatif des ARNm.

### **3. 2. p76 est peu abondante**

Une analyse par Western blot de lysats de différents tissus de souris a été réalisée (non montrée) et ne donne pas de résultat interprétable concernant la distribution de mp76 : de nombreuses espèces protéiques sont révélées ; presque aucune n'est reconnue simultanément par les anticorps Crp76Ab et Irp76Ab. La même expérience a été réalisée par Deuschl et al. (Deuschl et al., 2006) avec le sérum anti-mp76 dont ils disposent. Elle donne des résultats tout aussi ininterprétables. mp76 n'est probablement pas détectable dans des lysats totaux, du fait de sa faible abondance ; il est nécessaire de surexprimer p76, ou d'enrichir ou de purifier les échantillons pour étudier p76.

La faible abondance de hp76 était déjà mise en évidence parmi les protéines M6P de cellules U937 purifiées par affinité sur du sCI-MPR immobilisé. hp76 représente 2 % de ces protéines selon l'analyse réalisée par le logiciel Melview sur le gel de la Figure 7. Sachant que les protéines lysosomales solubles et membranaires représentent moins de 1% du protéome cellulaire (Beaufay, 1972), une estimation approximative du pourcentage de p76 parmi les protéines cellulaires est de moins de 0,02 %.

### **3. 3. p76 est une protéine lysosomale**

Les protéines qui portent des sucres M6P sont quasiment toutes des protéines lysosomales. Cependant, il existe quelques protéines non lysosomales qui portent ces sucres, par exemple la rénine (Faust et al., 1987) ou la thyroglobuline (Herzog et al., 1987). Par ailleurs, une étude récente a montré qu'une faible proportion des protéines du plasma, non lysosomales, portaient des sucres M6P (Sleat et al., 2006a). Ceci renforce la nécessité de déterminer la localisation sub-cellulaire d'une protéine porteuse de M6P nouvellement identifiée comme p76.

Les études protéomiques ayant identifié p76 favorisaient l'hypothèse d'une localisation lysosomale de p76, sans cependant en apporter la démonstration :

Par exemple, dans l'étude protéomique des granules de neuromélanine de cerveau humain, hp76 fait partie des 4 protéines identifiées de fonction inconnue (Tribl et al., 2005). Or, les auteurs démontrent que ces granules sont des organites dérivés des lysosomes, car sur les 72 protéines identifiées, 25 protéines sont lysosomales. Dans l'étude protéomique menée par Kollmann et al., à partir de sécrétions de MEF de souris, les auteurs ont cloné le gène codant

pour mp76, et ont exprimé mp76 sous forme recombinante et purifiée. A partir de ce matériel, ils ont montré que mp76 était internalisée par endocytose dans les cellules MEF, de manière dépendante du M6P et qu'elle était finalement localisée dans les lysosomes (Kollmann et al., 2005). Par ailleurs, le groupe de Lobel a poursuivi ses recherches en menant une étude protéomique des protéines M6P du plasma humain. Quarante-quatre protéines lysosomales connues ont été identifiées parmi 148 protéines M6P (Sleat et al., 2006a). Il est connu qu'une petite proportion des protéines lysosomales est circulante, mais elles sont très peu abondantes par rapport aux protéines plasmatiques (1-100 µg/L contre 0,5 g/L en moyenne pour une protéine plasmatique). Les auteurs définissent trois critères (enrichissement après un deuxième cycle de purification sur le sCI-MPR, activité prédite ou connue d'hydrolase et faible abondance dans le plasma) pour sélectionner des protéines candidates comme nouvelles protéines lysosomales. Sur 80 protéines M6P non connues comme étant lysosomales, purifiées à partir du plasma, hp76 fait partie des 9 protéines candidates retenues selon ces critères.

Nous avons donc étudié et démontré la localisation lysosomale de p76 grâce à des études en immunofluorescence (IF) et des fractionnements subcellulaires sur du foie de souris.

Les expériences d'IF réalisées sur des cellules qui surexpriment hp76 avec ou sans étiquette, ou mp76 ont montré une co-localisation de p76 avec les marqueurs des lysosomes comme LAMP-1 ou la cathepsine D. La co-localisation n'est certes pas totale : la plupart des vésicules sont co-marquées par p76 et le marqueur lysosomal. Cela illustre le fait que les lysosomes n'ont pas tous strictement la même composition, probablement en fonction de leur âge ou du processus catabolique dans lequel ils sont engagés.

Les fractionnements subcellulaires ont clairement permis de démontrer que le fragment C-terminal mp27 de mp76 endogène est lysosomal : il suit la même distribution que les marqueurs classiques lysosomaux dans un fractionnement total de foie de souris, dans des gradients de densité, avec ou sans réduction de la densité des lysosomes, et il a les mêmes propriétés de latence.

Un fragment N-terminal de mp76, de 33 kDa, serait peut-être aussi lysosomal, mais notre anticorps Nmp76Ab n'est pas assez spécifique pour tirer une conclusion certaine. Il aurait fallu pouvoir détecter ce même fragment de manière plus claire dans des souris normales, et pas uniquement dans des souris injectées au Triton WR-1339. L'utilisation du Triton WR-1339 *in vivo* provoque une hyperlipidémie et une hypercholestérolémie, qui sont dues à un blocage de la dégradation des lipoprotéines plasmatiques par inhibition de l'activité de la lipoprotéine lipase (Borensztajn et al., 1976), accumulation dans le sang des VLDL sécrétées

par le foie (Otway and Robinson, 1967) et augmentation de la synthèse hépatique du cholestérol (Frantz and Hinkelman, 1955). L'apparition des fragments de mp76 comme une conséquence de ces pathologies semble cependant peu probable. Il nous semble plutôt que la faible spécificité de l'anticorps ne permette pas de détecter mp76 dès lors qu'elle est présente dans des échantillons trop complexes. Un autre anticorps serait nécessaire pour résoudre ce problème.

Récemment, l'équipe de Lübke. a également montré la localisation lysosomale de mp76 par des techniques très similaires aux nôtres (Deuschl et al., 2006). Le sérum anti-mp76 utilisé leur permet de détecter la mp76 endogène des MEF en IF. mp76 se trouve à l'intérieur de structures en anneaux marquées par LAMP-1. Ensuite, l'équipe de Lübke a analysé la distribution de mp76 par des fractionnements subcellulaires qui se limitent à la séparation d'une fraction ML de foie de souris traitée au Triton WR-1339 sur un gradient de densité discontinu de saccharose formé de quatre couches de solutions de saccharose de différentes densités. Après centrifugation, les tritosomes sont récupérés à l'interface 14,1-34,5% de saccharose (appelée « F2 ») alors que les mitochondries et les péroxisomes sont présents dans la couche à 45 % de saccharose. (Leighton et al., 1968). Deuschl et al. analysent quatre fractions du gradient par Western blot (F2 et les fractions F1, F3 et F4 non explicitées mais qui correspondent probablement aux interfaces air-14,1%, 34,5-45 % et 45-60,7% de saccharose, respectivement). Deux fragments à 30 et 15 kDa sont intensément révélés dans la fraction F2 avec le sérum anti-mp76. Un aspect critiquable de cette expérience est l'absence de comparaison avec une souris témoin. Dans notre étude, nous estimons ne pas pouvoir conclure sur la localisation lysosomale du fragment que nous observons à 33 kDa avec Nmp76Ab dans les souris ayant reçu une injection de Triton WR-1339 justement parce que ce fragment n'est pas détecté dans les échantillons témoins. Ensuite, on ne peut pas savoir si le fragment observé à 30 kDa par l'équipe de Lübke correspond à mp27 ou au fragment N-terminal de 33 kDa détecté uniquement dans les souris injectées au Triton WR-1339 (Figure 46) de notre étude. En effet, le sérum anti-mp76 employé par Deuschl et al. reconnaît toutes les espèces, N- et C-terminales, de mp76. Il en est de même pour le fragment à 15 kDa qu'ils détectent : on ne peut pas savoir s'il s'agit du doublet C-terminal que nous détectons en transfection transitoire (Figure 32) ou s'il s'agit des bandes vers 20 kDa N-terminales que nous détectons dans les échantillons uniquement dans les souris injectées au Triton WR-1339 (Figure 46, Figure 49).





### III . CHAPITRE III : FONCTION DE P76

Lorsque de nouvelles protéines sont identifiées par analyse protéomique, la recherche de leur fonction est une problématique majeure, car aucune piste fonctionnelle n'est apportée initialement. Les recherches d'homologie de séquence peuvent donner des indications, par comparaison de la séquence d'intérêt avec celles de protéines de fonctions connues. Dans le cas de p76, la seule protéine de séquence homologue ayant une fonction associée était la phospholipase B de l'amibe *Dictyostelium discoideum* (Dd-PLB), avec 37 % d'identité de séquence.

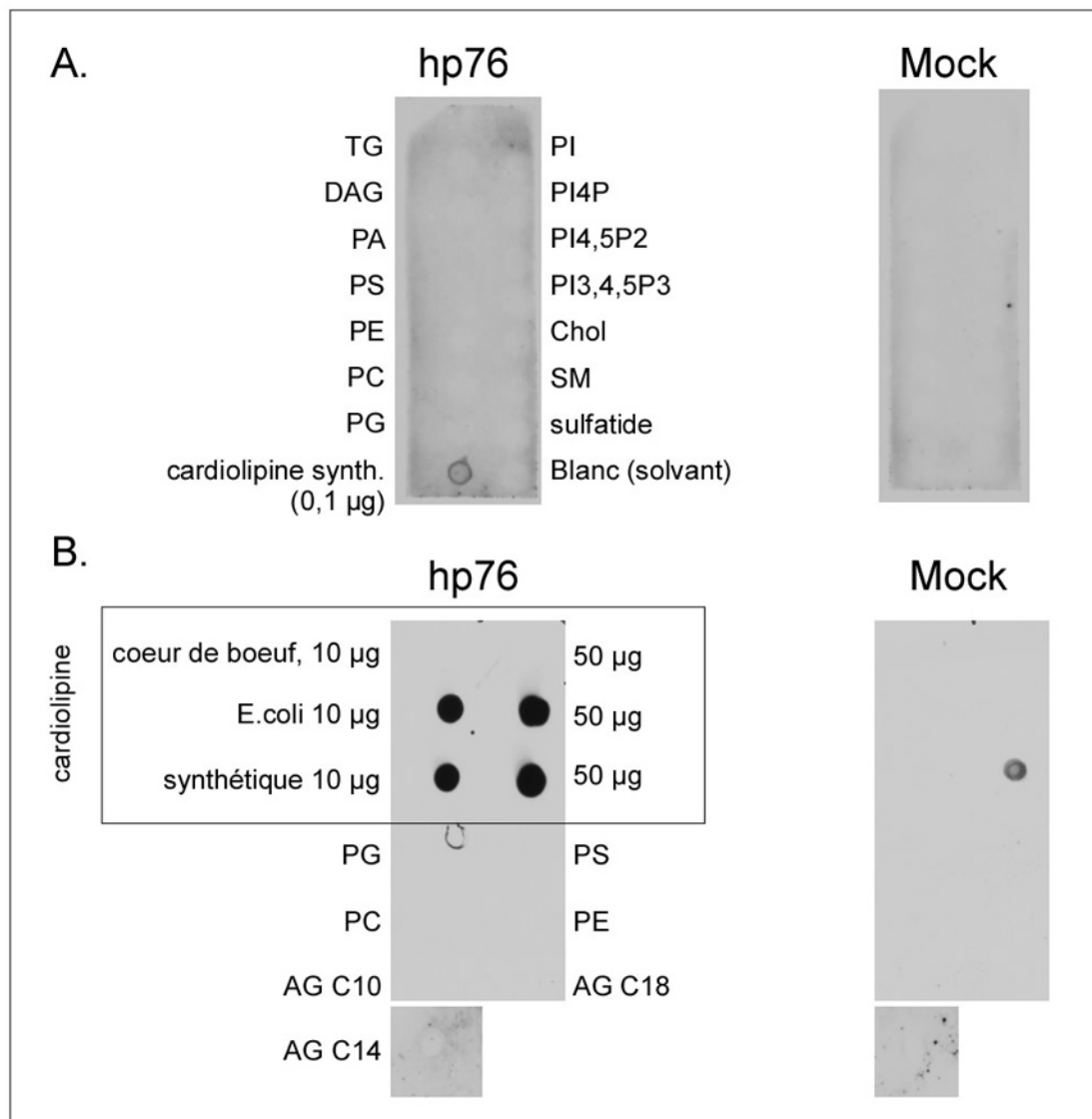
La question posée dans le cadre de cette thèse était donc : « p76 est-elle une phospholipase B, A1 ou A2 ? ». Comme il a été démontré que p76 était lysosomale, cette hypothèse nous a semblé plausible, car un rôle d'hydrolase est cohérent pour une protéine soluble lysosomale, et toutes les phospholipases lysosomales ne sont pas clonées à ce jour (Hostetler et al., 1982; Mellors and Tappel, 1967; Piret et al., 2005).

Ce chapitre présente quelques expériences avec hp76 recombinante visant l'étude de sa liaison à des phospholipides et la mise en œuvre de tests d'activité.

#### 1. Expériences de liaison aux phospholipides

Dans le but de connaître plus précisément le substrat potentiel de p76, son affinité pour différents phospholipides a été testée par des analyses en «fat blot». Ces expériences consistent à déposer des lipides sur une membrane de nitrocellulose, puis à incuber séquentiellement la membrane avec la protéine d'intérêt, un anticorps primaire dirigé contre cette protéine et enfin un anticorps secondaire couplé à la peroxidase. Plusieurs expériences ont été réalisées, à partir de membranes commerciales ou préparées au laboratoire. Les membranes ont été incubées en présence de 1µg/mL de protéine hp76-myc provenant de surnageant de culture de cellules 293/hp76-myc concentré (non purifié).

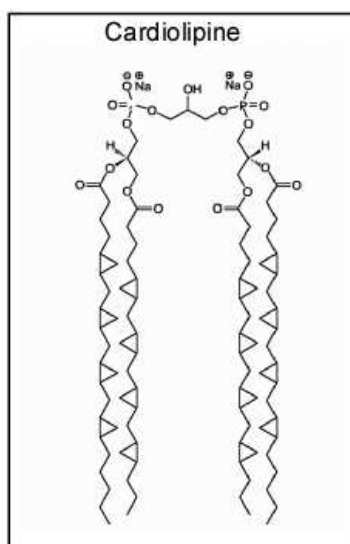
En partant d'une membrane commerciale comportant un large panel de phospholipides et de lipides, il s'est avéré que hp76-myc liait un seul type de phospholipide : la cardiolipine (Figure 50A).



**Figure 50. Fat blots.**

Des membranes de nitrocellulose portant des phospholipides et des acides gras commerciales (A) ou préparées au laboratoire (B) ont été incubées séquentiellement avec du surnageant de culture concentré 1000 fois soit de cellules 293/hp76-myc, soit de cellules 293/mock, puis avec Nhp76Ab et enfin avec un anticorps secondaire couplé à la peroxidase. (A) : 100 pmoles de chaque composé, soit approximativement 50 ng de phospholipides (cf Matériel et Méthodes pour le détail des lipides déposés). (B) PG : phosphatidylglycérol (50 µg), PS : phosphatidylsérine (50 µg), PC : phosphatidylcholine (60 µg), PE : phosphatidyléthanolamine (60 µg), AG : acide gras (60 µg).

La cardiolipine est un phospholipide particulier, ayant une structure de « double phospholipide » où un glycérol central lie deux acides phosphatidiques (Figure 51). La cardiolipine comporte ainsi 4 chaînes d'acides gras. Le type de cardiolipine déposé sur la membrane commerciale est de la cardiolipine synthétique avec 4 chaînes d'acide myristique (C14).



**Figure 51. Structure de la cardiolipine.**

Les expériences ont été poursuivies, en déposant nous-mêmes différentes sortes de cardiolipines sur des membranes de nitrocellulose : de la cardiolipine synthétique (équivalente à celle déposée sur la membrane commerciale), de la cardiolipine purifiée à partir de *E. coli* ou de la cardiolipine purifiée à partir de cœur de bœuf. Le cœur de bœuf est très riche en mitochondries, elles-mêmes riches en cardiolipine. Les différences entre ces cardiolipines se situent au niveau des chaînes d'acide gras, qui sont à 87% des acides linoléiques (C18 :2) pour la cardiolipine de cœur de bœuf, alors que la cardiolipine de *E. coli* a des chaînes d'acide gras plus courtes et saturées. En outre, divers acides gras ont été déposés sur ces membranes de nitrocellulose, en particulier de l'acide myristique (C14), pour déterminer si l'affinité de hp76 était spécifique de la cardiolipine ou des acides gras C14. Ce point était important à vérifier, car la Dd-PLB, la protéine homologue de p76 chez *Dictyostelium discoideum*, avait été purifiée par affinité grâce au groupement myristoyl de la protéine ARF-1 (Morgan et al., 2004). Le résultat de cette deuxième analyse par fat blot est que hp76-myc se fixe sur la cardiolipine synthétique et sur celle de *E. coli*, mais pas sur celle de cœur de bœuf, ni sur les acides gras (Figure 50B). Le contrôle négatif, qui correspond au surnageant de culture des cellules 293/mock incubé en parallèle sur une membrane identique, est effectivement toujours négatif, ce qui valide nos observations. Un signal apparaît cependant en présence d'une quantité importante de cardiolipine synthétique (Figure 50B), mais son intensité est significativement plus faible que l'intensité du signal hp76-myc. Ainsi, dans la configuration de ces tests, hp76-myc lie les cardiolipines à chaînes d'acide gras courtes et saturées. On peut noter que hp76-myc reconnaît aussi le phosphatidylglycérol (PG), même si l'intensité du signal est très faible. Ceci est cohérent avec une affinité de hp76-myc pour la cardiolipine, car

elle est composée d'un PG dont un groupement hydroxyle est estérifié par un acide phosphatidique.

## **2. Tests d'activité phospholipase**

La seule piste fonctionnelle que nous avons concernant p76 est son homologie de séquence avec la phospholipase B de *Dictyostelium discoideum*. Ainsi, nous avons mis en oeuvre des tests fonctionnels avec hp76-myc pour détecter une activité phospholipase A, car l'activité de type phospholipase B recouvre les deux activités A1 et A2. Nos expériences sont réalisées à 37°C, le plus souvent dans un tampon contenant des sels de calcium, au cas où le  $\text{Ca}^{2+}$  soit nécessaire à l'activité et de pH acide (tampon acétate de pH 5,5 à 4,0). Comme p76 est une protéine lysosomale, elle se trouve dans environnement acide, et il est probable qu'elle soit le plus active à ce pH, comme le sont la plupart des hydrolases lysosomales.

Le substrat est préparé sous forme de micelles mixtes ou de liposomes. Les liposomes sont organisés en vésicules bicouches ou multilamellaires, de taille généralement assez variable, alors que les micelles sont petites, et ne forment pas de bicouches (cf Introduction). La préparation des micelles mixtes de phospholipides consiste simplement à les mélanger avec un détergent. A partir de ces micelles mixtes, les liposomes peuvent être préparés par une étape supplémentaire de dialyse pour enlever le détergent. Une autre méthode pour préparer des liposomes consiste à mélanger les phospholipides avec un tampon sans détergent et à les soniquer jusqu'à ce qu'ils forment une solution opalescente stable (cf Matériel et Méthodes).

### **2. 1. Tests en milieu liquide et analyse des produits par CCM**

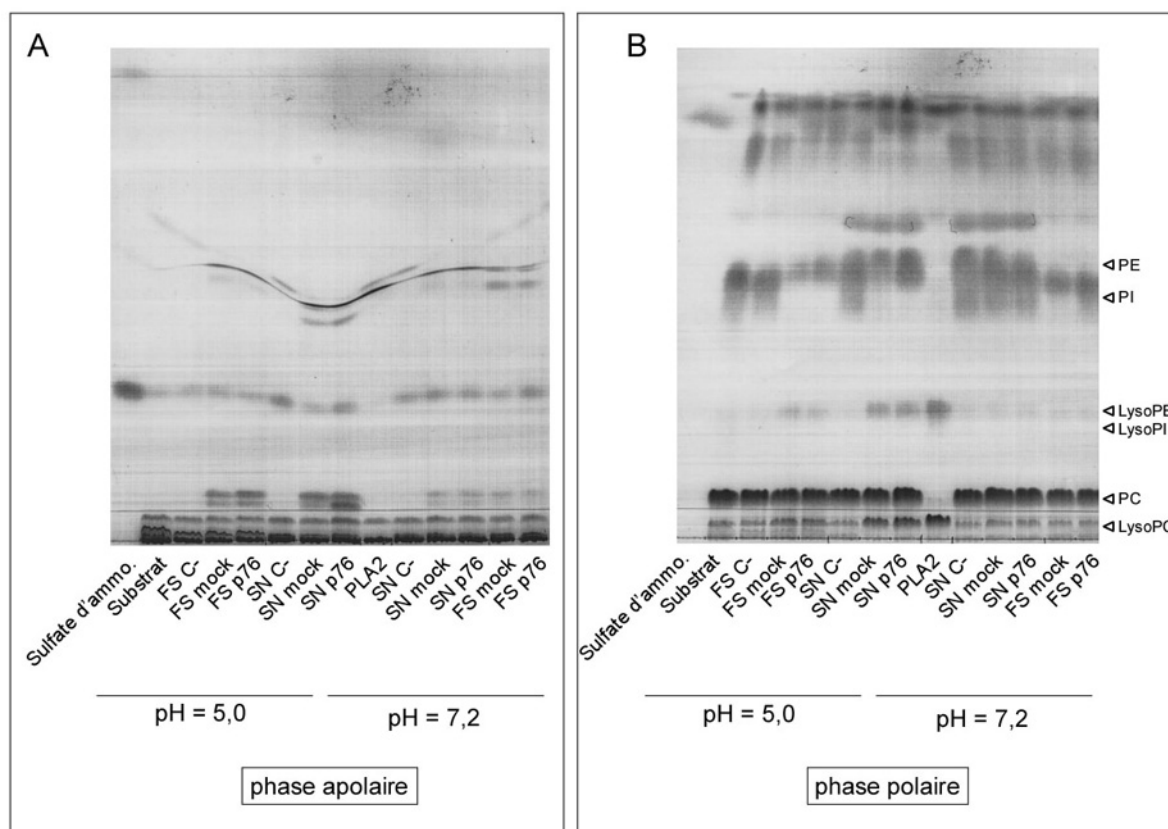
Dans un premier temps, l'affinité de p76 pour la cardiolipine étant encore inconnue, nous avons employé l'asolectine comme substrat pour réaliser des tests d'activité. L'asolectine est un mélange de phospholipides de soja, composé approximativement de 30 % de phosphatidylcholine (PC), 30 % de phosphatidyléthanolamine (PE), 20 % de phosphatidylinositol (PI), le reste étant composé d'autres phospholipides et des lipides neutres. Les acides gras sont dans les proportions suivantes : 14% saturés, 24% mono-insaturés et 62 % de poly-insaturés. L'idée était qu'un mélange complexe de phospholipides offrait de plus grandes chances d'être en présence du bon substrat. Ce substrat a été préparé sous forme de liposomes, dans deux sortes de tampons, l'un à pH 5,2 et l'autre à pH 7,2.

La source de hp76 disponible au moment de ce test était la lignée CHO/hp76-myc. Nous avons utilisé le surnageant de culture de ces cellules, dont les protéines ont été précipitées au

sulfate d'ammonium pour les concentrer, mais également la fraction soluble issue d'un fractionnement subcellulaire de ces cellules, avec l'idée que hp76-myc intracellulaire avait de plus grandes chances d'être sous sa forme active. Deux types de contrôles négatifs ont été réalisés : l'un était la lignée CHO/mock, dont le surnageant et la fraction soluble ont été préparés en parallèle de ceux de la lignée CHO/hp76-myc, l'autre consistait en les échantillons de CHO/hp76-myc bouillis pendant 15 minutes. Le contrôle positif était constitué de l'enzyme PLA2 de pancréas de porc (PLA2pp), mélangée à l'asolectine préparée de manière identique à celle incubée avec les échantillons de CHO, excepté que la solution de réaction était du Tris 10 mM, CaCl<sub>2</sub> 2 mM, pH 7,2.

Le substrat a été mélangé avec les échantillons, puis la réaction a été effectuée pendant 16 heures à 37°C, sous agitation. A la fin de la réaction, les lipides ont été extraits par un mélange de chloroforme/méthanol et ils ont été séparés sur plaque de chromatographie en couche mince (CCM). Les lipides ont été déposés en double, sur deux plaques de CCM. Les deux plaques ont ensuite été placées dans une cuve avec un solvant apolaire. A la fin de la migration, l'une des deux plaques a été révélée au sulfate de cuivre (Figure 52), alors que l'autre a été placée dans une cuve avec un solvant polaire, séchée puis révélée au sulfate de cuivre. Cette méthode a été appliquée d'une part, pour ne pas passer à côté d'une éventuelle activité de p76 sur un lipide neutre, et d'autre part, pour améliorer le profil des phospholipides qui migrent dans la phase polaire.

La Figure 52 montre les résultats obtenus. Les dépôts sur la plaque de CCM correspondent à 1 mL de surnageant concentré (équivalent d'environ  $2 \times 10^6$  cellules) ou à  $9 \times 10^5$  cellules pour la fraction soluble. Dans la phase apolaire, des produits identiques aux deux lignées CHO apparaissent, en milieu acide, dans le surnageant et la fraction soluble. Ces produits ne sont pas des dérivés de phospholipides, car ils migrent dans la phase apolaire. Nous n'avons pas cherché à les caractériser, car ils sont identiques pour les échantillons hp76-myc et « mock ». Dans la phase polaire, des produits de réaction apparaissent le plus clairement dans les surnageants de culture, identiques dans les deux lignées CHO/hp76-myc et CHO/mock, à pH acide. Comme ces produits migrent à la même distance de migration que les produits obtenus avec la PLA2pp, ce sont les lysophospholipides issus des PC et PE de l'asolectine (indiqués par les flèches). La migration des PC et PE dans ce type de solvant a été vérifiée au cours d'autres expériences, avec des échantillons standards (non montré). Ces produits témoignent d'une activité phospholipase acide dans les surnageants de CHO, mais qui n'est pas due à hp76-myc.



**Figure 52.** Analyse en CCM des produits d'un test fonctionnel réalisé avec la lignée CHO/hp76-myc sur des liposomes d'asolectine.

Des liposomes d'asolectine à pH 5,0 ou 7,2, sont laissés à 37°C pendant 16 heures sous agitation en présence d'échantillons préparés à partir de cellules CHO/hp76-myc ou CHO/mock : fraction soluble (FS, équivalent à  $9 \times 10^5$  cellules) ou surnageants de culture précipités au sulfate d'ammonium (SN, équivalent à 1 mL). « Sulfate d'ammo. » est une solution de sulfate d'ammonium concentrée dans l'eau, « Substrat » est l'asolectine incubée seule, « C- » est le contrôle négatif (échantillon de CHO/hp76-myc bouilli pendant 15 minutes), « PLA2 » est le contrôle positif (asolectine incubée avec la PLA2pp). Après la réaction, les lipides sont extraits par un mélange chloroforme/méthanol, déposés en double sur deux plaques de CCM. Ces plaques sont placées dans une cuve avec un solvant apolaire (A), puis l'une des deux plaques est placée dans une cuve avec un solvant polaire (B). Les composés sont révélés au sulfate de cuivre.

Ces tests ne se sont pas avérés concluants, comme aucun produit de réaction n'est apparu spécifiquement dans les échantillons hp76-myc. Cependant, un point critique de cette expérience concerne la quantité de hp76, peu abondante dans le surnageant de CHO/hp76-myc (cf Matériel et Méthodes, Figure 26).

Plus tard, nous avons réalisé une expérience semblable en utilisant une source plus riche en hp76-myc, à savoir les surnageants de culture de cellules 293/hp76-myc. Les conditions réactionnelles ont été un peu modifiées : le substrat était de l'asolectine en micelles avec du Triton X-100, il est fréquemment employé dans les protocoles écrits dans la littérature pour étudier les hydrolases lysosomales (Grabowski et al., 1990; Hostetler et al., 1982; Mellors and Tappel, 1967). Après une réaction de 15 heures, à 37°C, sous agitation, les lipides ont été

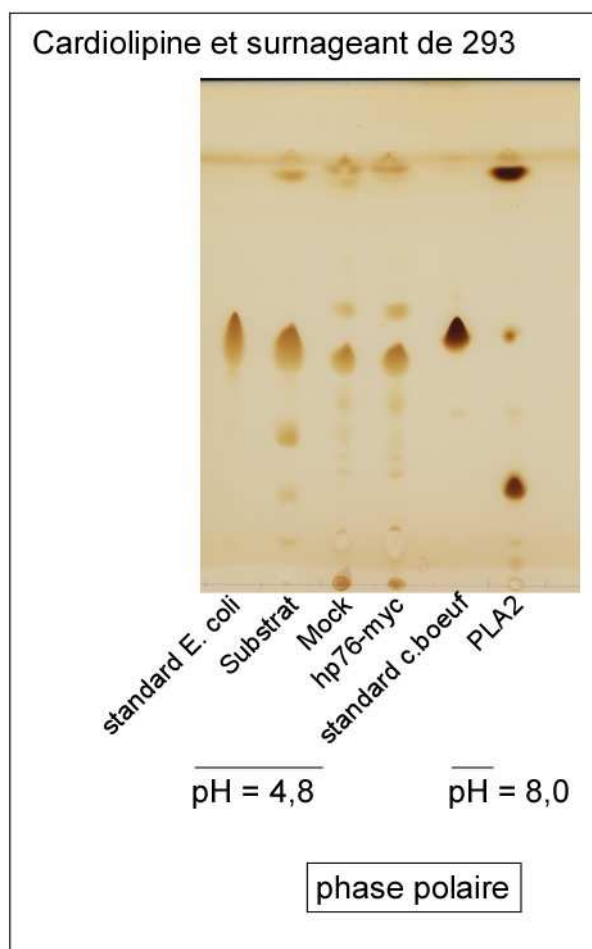
extraits par un mélange méthanol/chloroforme. L'équivalent de 1,5 mL de surnageant (soit approximativement 0,2 µg de hp76-myc) a été déposé en double sur deux plaques de CCM, puis soumises au même traitement que celui décrit précédemment. A nouveau, les produits de cette réaction étaient des lysophospholipides en proportion identique dans le surnageant de culture des cellules 293/mock et celui des 293/hp76-myc (non montré).

Lorsque l'affinité de hp76-myc pour la cardiolipine a été découverte, nous avons mis en œuvre une réaction avec la cardiolipine. La cardiolipine extraite à partir de *E. coli* a été choisie car nos tests en fat blot indiquaient une plus forte liaison de hp76-myc avec ce type de cardiolipine. Elle a été préparée en micelles avec du CHAPS. Une grande quantité de hp76-myc a été utilisée dans cette expérience : 150 mL de surnageant de culture de cellules 293/hp76-myc a été précipité au sulfate d'ammonium, puis dialysés et concentrés par ultrafiltration 3800 fois. La quantité de hp76-myc est estimée à 22 µg. Le contrôle négatif est le même volume de surnageant de culture des cellules 293/mock, traité de manière similaire, en parallèle. Un autre contrôle était constitué de la cardiolipine incubée seule, et traitée de manière identique aux échantillons contenant hp76-myc. Le contrôle positif était constitué de la PLA2pp, mélangée à la cardiolipine préparée dans du Tris 10 mM, CaCl<sub>2</sub> 2 mM, à pH 8,0, CHAPS 0,1%. Après 6 heures de réaction, la cardiolipine et les produits de la réaction ont été extraits au méthanol/chloroforme et la totalité de l'extraction de chaque échantillon a été déposée sur une seule plaque de CCM, placée dans une cuve avec une phase polaire.

La Figure 53 montre le résultat obtenu. Des produits d'hydrolyse apparaissent dans l'échantillon hp76-myc, mais, à nouveau, ils sont identiques à ceux observés dans l'échantillon « mock ».

Toute la cardiolipine de ces échantillons n'a pas été hydrolysée. Il semble qu'une activité contaminante, présente dans le surnageant de culture de ces lignées, hydrolyse la cardiolipine et/ou la lysocardiolipine. La lysocardiolipine correspond à la cardiolipine dont une ou plusieurs chaînes d'acide gras ont été hydrolysées. Ainsi, plusieurs types de lysocardiolipines peuvent être formés, car la cardiolipine comporte quatre chaînes d'acide gras. Le contrôle négatif du substrat incubé seul fait apparaître un produit, malgré l'utilisation de tampon stérile (cela est certes problématique pour l'interprétation). Ce produit est différent de celui formé avec la PLA2pp, qui, en théorie, est une di-lysocardiolipine avec seulement deux chaînes d'acide gras en *sn1*. La conclusion de cette expérience est qu'une activité de type phospholipase A ou B spécifique de hp76-myc n'est clairement pas détectée. Il sera nécessaire de purifier hp76 pour débarrasser des activités contaminantes du surnageant.





**Figure 53.** Analyse en CCM des produits d'un test fonctionnel réalisé avec la lignée 293/hp76-myc sur des micelles mixtes de cardiolipine.

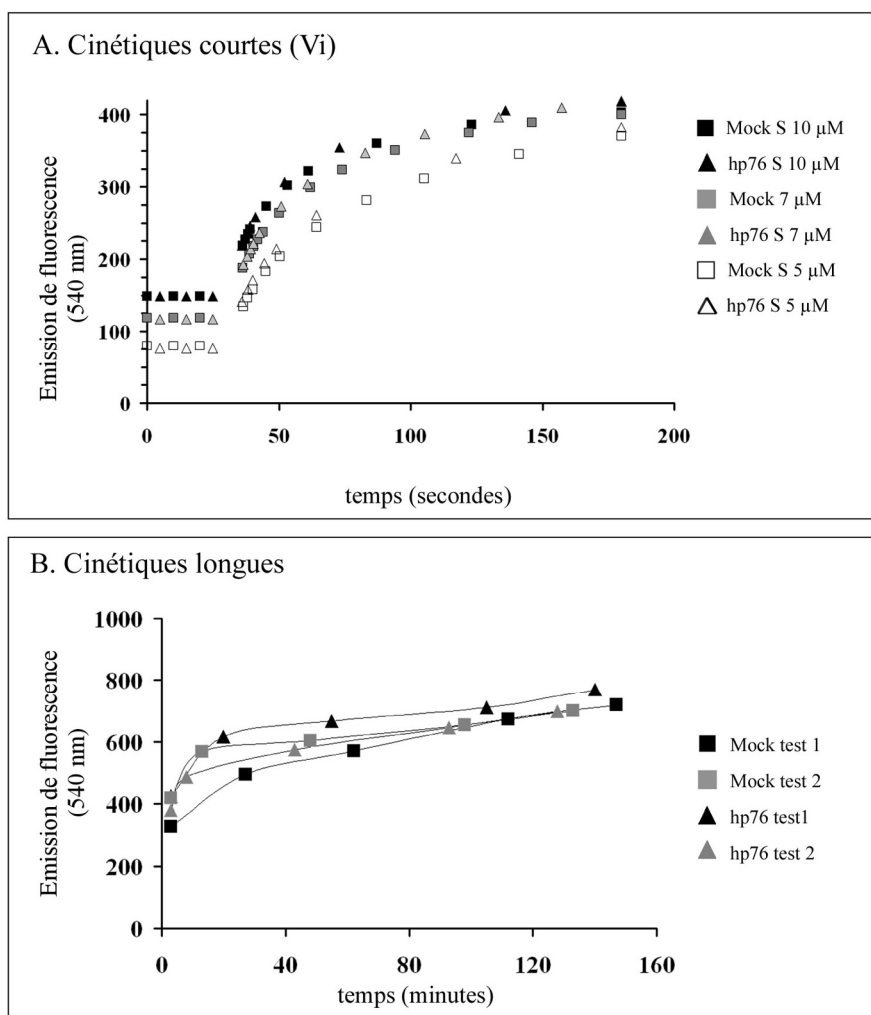
Des micelles de cardiolipine (purifiée à partir de *E. coli*) et CHAPS 0,1 % en tampon acétate à pH 4,8 sont incubées à 37°C en présence de 150 mL de surnageant de culture de cellules 293/hp76-myc ou 293/mock concentré 3800 fois. Après 6 heures de réaction, les lipides sont extraits, déposés sur une plaque de CCM, séparés dans un solvant polaire et révélés à l'I<sub>2</sub>. Un autre contrôle négatif est la cardiolipine incubée seule (« Substrat »). Le contrôle positif est la cardiolipine préparée dans un tampon basique (pH 8,0), mise en présence de PLA2pp. Les standards sont la cardiolipine de *E. coli* et de cœur de bœuf, solubilisés en chloroforme.

## 2. 2. Tests en milieu liquide avec des substrats fluorescents

Les mesures d'activité avec des substrats fluorescents sont décrites comme étant très sensibles (Feng et al., 2002). Dans ces tests, un analogue fluorescent de phosphatidylcholine est utilisé en milieu liquide, et incubé avec hp76-myc, issu de cellules 293/hp76-myc. Un clivage de ce composé par une activité phospholipase A2 ou A1 entraîne une augmentation de la fluorescence, que l'on peut mesurer à la fin de la réaction ou suivre en temps réel avec un spectrofluorimètre.

### 2. 2. 1. Phosphatidylcholine-NBD

La phosphatidylcholine-NBD a été utilisée seule, sans être préparée spécifiquement sous forme de liposomes avec d'autres phospholipides ou sous forme de micelles avec un détergent. Un petit volume de la solution mère en éthanol est dilué par injection dans un grand volume de tampon de réaction. Par ce moyen de préparation, le substrat forme naturellement des micelles (Campbell, 1995). Une augmentation linéaire de l'émission de fluorescence est mesurée avec 2 unités de PLA2pp ajoutée à 5  $\mu\text{M}$  de substrat NBD-PC préparé dans du Tris 10 mM,  $\text{CaCl}_2$  2 mM, pH 8,0, témoignant de la capacité de ce test à mesurer une activité PLA2.



**Figure 54. Test d'activité avec un analogue fluorescent de phosphatidylcholine (NBD-PC).** L'augmentation de la fluorescence, à 540 nm est suivie soit sur 3 minutes avec 5, 7 ou 10  $\mu\text{M}$  de NBD-PC (A), soit sur des durées longues, avec 5  $\mu\text{M}$  de NBD-PC (B) dans un tampon acétate 50 mM,  $\text{CaCl}_2$  2mM, pH 5,0 après ajout de fractions solubles de cellules 293/ hp76-myc ou «mock» (90  $\mu\text{g}$  de protéines totales, équivalent à  $2 \times 10^6$  cellules) . (B) Deux expériences indépendantes ont été réalisées (tests 1 et 2).

La source de hp76 utilisée dans cette série de tests a été principalement la fraction soluble (FS) de cellules 293/hp76-myc (90 µg de protéines totales, équivalent approximatif de  $2 \times 10^6$  cellules), avec la fraction soluble des cellules 293/mock comme contrôle négatif. Pour cette expérience, des quantités semblables de cellules 293/hp76-myc et 293/mock ont été récoltées et préparées en parallèle. Nous avons choisi de réaliser ces tests avec une même quantité de protéines (estimé par un dosage au BCA).

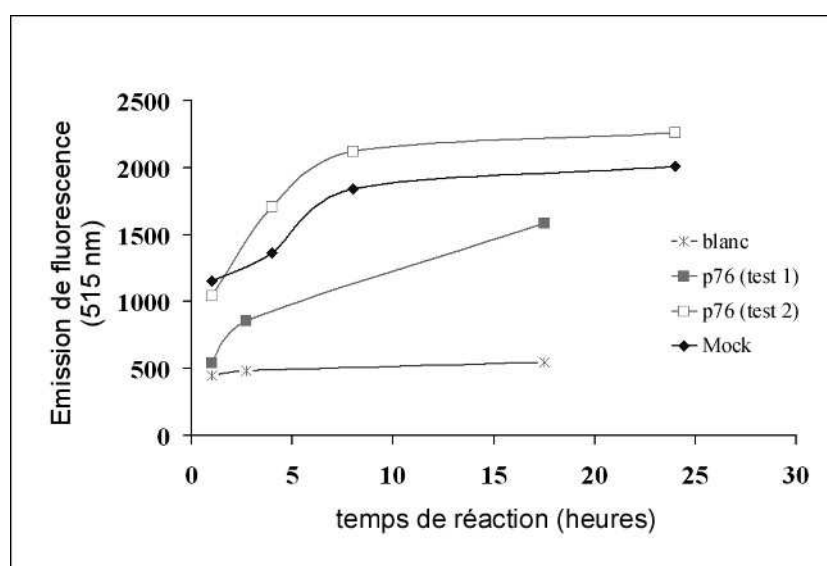
Les mesures de fluorescence ont été faites soit sur des courtes durées, en mesurant la pente de la courbe sur quelques minutes, soit sur des durées longues, au quel cas la cuve est gardée à température ambiante dans le noir, et la fluorescence est mesurée après un certain temps, après agitation du milieu réactionnel. A l'issue de deux expériences identiques et réalisées indépendamment, les FS «mock» et hp76-myc présentent des courbes d'émission de fluorescence très similaires (Figure 54), qu'elles soient mesurées sur des temps courts ou longs. Ce résultat (Figure 54) ne relate qu'une partie des conditions testées avec les FS «mock» et hp76-myc. De nombreuses autres conditions ont été testées : tampon acétate à différentes molarités, tampon citrate, différents pH, présence de  $\text{CaCl}_2$  ou d'EDTA. Les courbes ont toujours été très similaires.

### 2. 2. 2. Phosphatidylcholine Bis-Bodipy C11

Le bis-Bodipy-PC est un analogue de la phosphatidylcholine qui a deux groupements fluorescents à la place des acides gras en *sn1* et *sn2* (Figure 12). Lorsque cette molécule est insérée dans des membranes ou des liposomes, elle n'est pas fluorescente. La fluorescence augmente lorsqu'un des deux, ou les deux fluorophores sont séparés physiquement, sous l'action d'une phospholipase A1 ou A2, et logiquement, sous celle d'une phospholipase B. Dans un protocole publié (Kim et al., 1997), les auteurs mesurent l'activité d'une phospholipase A2 lysosomale avec ce substrat fluorescent préparé sous forme de liposomes contenant des PC, PG, du cholestérol et du bis-Bodipy dans les proportions 10/2/3/0,05, à une concentration totale de 0,68 mM.

La configuration correcte du test pour mesurer une activité phospholipase A a été vérifiée avec la PLA2pp : une augmentation de l'émission de la fluorescence à 515 nm a été enregistrée pour des liposomes de composition identique préparés dans du Tris 10 mM,  $\text{CaCl}_2$  2 mM, pH 8,0, mis en présence de 1 ou 2 unités de PLA2pp et traités comme les échantillons hp76-myc (non montré).

Ce test a été réalisé avec hp76-myc purifiée à partir du surnageant de culture de cellules 293/hp76-myc purifié sur une colonne IMAC d'ion cobalt. Deux expériences ont été réalisées avec 50 µg de hp76-myc purifiée dans un volume réactionnel total de 1,35 mL. Les contrôles négatifs sont des volumes identiques de tampon seul et de surnageant de culture de cellules 293/mock purifié de manière identique à celui des cellules 293/hp76-myc. Le suivi de l'activité dans le temps est fait par des prélèvements de 250µL de milieu réactionnel (correspondant à environ 9 µg de hp76-myc), espacés de plusieurs heures. La réaction est arrêtée par une dilution de l'aliquot dans du tampon réactionnel dont la fluorescence est mesurée et reportée sur un graphe (Figure 55).



**Figure 55. Test d'activité avec un analogue fluorescent de phosphatidylcholine (bis BODIPY-PC).** L'émission de fluorescence à 515 nm est mesurée après avoir incubé hp76-myc, «mock» ou du tampon tris-glycérol seul avec des liposomes contenant PC/PG/Cholestérol/bis-Bodipy-PC dans les rapports 10/2/3/0,05, à 37°C durant plusieurs heures. Deux expériences indépendantes ont été réalisées avec hp76-myc purifiée sur une colonne IMAC d'ion cobalt (tests 1 et 2). Le surnageant « mock » est purifié de manière identique.

La mesure d'activité avec hp76-myc a été réalisée deux fois (avec la même source de hp76-myc purifiée), de manière indépendante, avec une nouvelle préparation de liposomes. On remarque que dans les deux essais, l'émission de fluorescence augmente, mais que les valeurs absolues d'émissions de fluorescence sont très variables. Et surtout, on remarque que l'échantillon « mock » (testé sur la préparation de liposomes du test 2) contient également un composé qui provoque une augmentation de l'émission de fluorescence, et que donc, elle n'est pas due à la présence de hp76-myc. Par manque de temps, ce test n'a pas été réalisé dans d'autres conditions, comme par exemple, à d'autres pH, avec du  $\text{Ca}^{2+}$  ou des liposomes de composition légèrement différente.

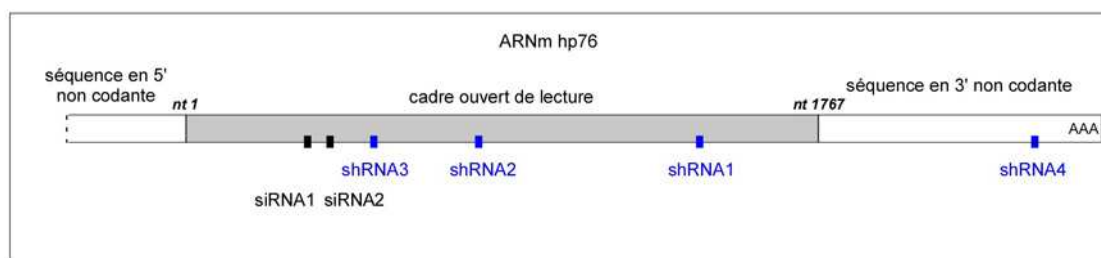
### 3. Extinction de hp76 par interférence à ARN

Si p76 était une hydrolase lysosomale, une suppression de son expression dans les cellules devrait provoquer, sur le long terme, une accumulation d'un substrat non dégradé, à l'image des cellules de personnes atteintes d'une maladie de surcharge lysosomale. Les techniques d'interférence à ARN permettent d'éteindre d'un gène particulier. Ces techniques exploitent un mécanisme physiologique des cellules eucaryotes par lequel des ARN non codants régulent l'expression de gènes codant pour des protéines. Ces ARN sont pris en charge par des complexes enzymatiques de cette voie (notamment, Dicer) et sont transformés en petits complexes doubles brins (les siRNA). Le brin anti-sens du siRNA s'associe alors avec un autre complexe enzymatique (le complexe RISC) et l'ARN messager (ARNm) qui s'hybride parfaitement avec le brin antisens est alors détruit (Hannon and Rossi, 2004).

Les techniques de RNAi ont été employées dans le cadre de cette thèse pour observer la morphologie des lysosomes en IF, tout en ayant conscience que la surcharge devait prendre un certain temps avant de provoquer un phénotype visible sur la morphologie des lysosomes.

#### 3. 1. Extinction de courte durée : duplexes de siRNA

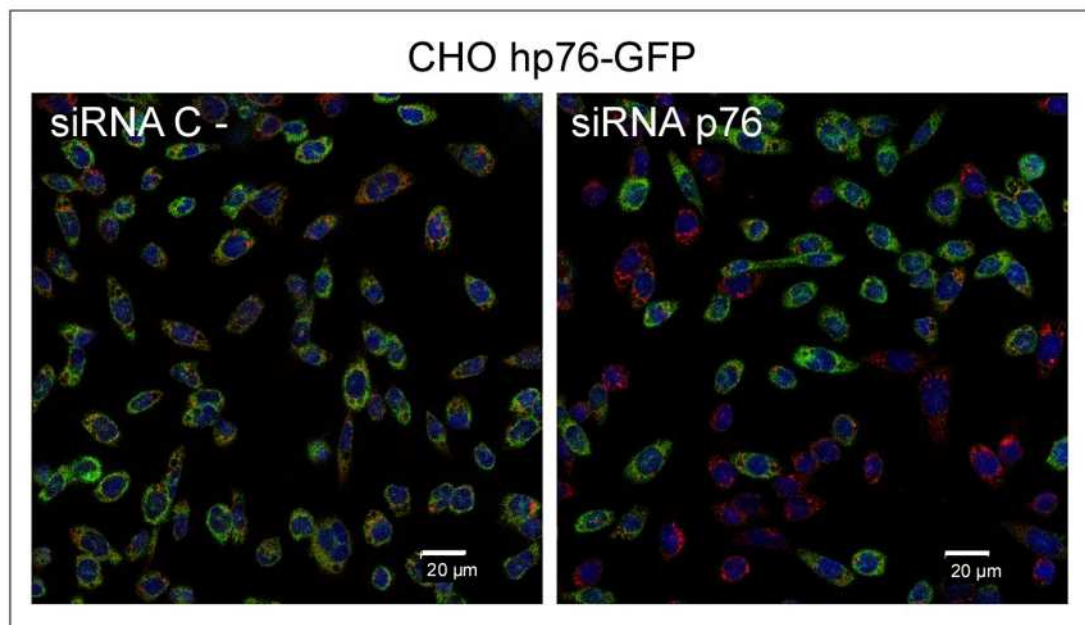
Dans un premier temps, des duplexes de siRNA (small interfering RNA) ciblant le gène de hp76 ont été employés (Figure 56). Ces duplexes ont été introduits dans les cellules par une transfection transitoire, dont l'effet ne dure que quelques jours. Nous voulions voir si son extinction entraînait rapidement un phénotype remarquable, comme ce pourrait être le cas si elle était impliquée dans la biogenèse des lysosomes, par exemple (Bucci et al., 2000).



**Figure 56. Position des duplexes de siRNA ciblant l'ARNm de hp76.**

Les duplexes de siRNA sont soit directement transfectés (siRNA1 et 2), soit formés après la transfection de plasmides codant pour des shRNA (shRNA1 à 4).

D'abord, l'efficacité des duplexes commerciaux supresseurs d'expression de hp76 a été vérifiée sur les cellules CHO/hp76-GFP (Figure 57). On voit clairement que la fluorescence hp76-GFP est éteinte lorsque les cellules ont incorporé un duplexe de siRNA ciblant hp76. En outre, des cellules ayant incorporé un duplexe non spécifique expriment toujours hp76-GFP.



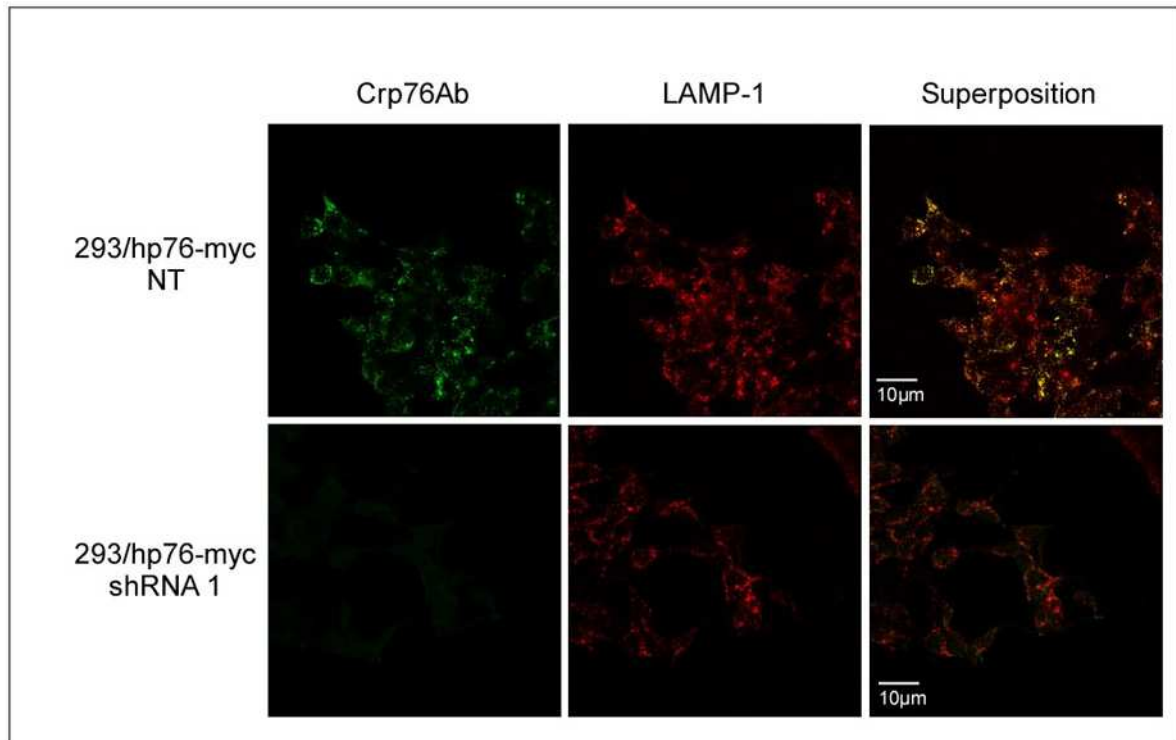
**Figure 57. Transfection de duplexes de siRNA sur des cellules CHO/hp76-GFP.**

Les cellules CHO/hp76-GFP sont ici transfectées avec le duplexes de siRNA1-biotine ciblant spécifiquement l'ARN messager de hp76 (siRNA p76, à droite) ou non spécifiques (contrôle négatif, C-, à gauche). Les duplexes portent une étiquette biotine, reconnue par un anticorps secondaire streptavidine-Cy3. hp76 est visualisée grâce à la fluorescence intrinsèque de la GFP.

Puis ces duplexes ont été transfectés sur des cellules HeLa normales. Après 3, 7 et 11 jours, les lysosomes des cellules HeLa transfectées ne sont pas agrandis, ils ne présentent pas une morphologie remarquable par une observation en immunofluorescence (non montré).

### 3. 2. Extinction de longue durée : transfection avec les shRNA

Pour pallier ce problème d'extinction du gène sur une courte durée, nous avons utilisé des plasmides commerciaux codant pour des shRNA (short hairpin RNA) spécifiques de la séquence de hp76 (Figure 56). Après transfection, les cellules produisent des particules de shRNA qui entrent dans la voie de RNAi et sont transformés en duplexes de siRNA. Du fait qu'ils sont portés par un plasmide, les shRNA peuvent être transfectés de manière stable dans les cellules et donc s'exprimer en permanence. Ceci permet une extinction ou au moins une réduction permanente de l'expression du gène d'intérêt, contrairement aux siRNA.



**Figure 58. Transfection des cellules 293/hp76-myc avec un plasmide de shRNA spécifique de hp76.** Lignées de cellules 293/hp76-myc transfectées ou non avec le plasmide de shRNA1 ciblant spécifiquement hp76. Le marquage LAMP-1 permet de visualiser les lysosomes. La protéine hp76-myc est détectée avec l'anticorps Crp76Ab.

La lignée 293/hp76-myc a été transfectée séparément avec les 4 plasmides ciblant l'ARNm de hp76, pour établir des lignées stables. Cette lignée 293/hp76-myc, qui surexprime hp76-myc, a été choisie pour faciliter le criblage par immunofluorescence des plasmides permettant l'extinction de l'expression de hp76-myc, car hp76 endogène n'est pas visualisée par IF (ni par Western blot). Ainsi, sur les quatre plasmides, trois éteignent efficacement le signal hp76-myc (shRNA1, shRNA2 et shRNA4). L'extinction obtenue avec un des plasmides (shRNA1) est montré dans la Figure 58. Les premiers résultats ont montré que les lysosomes de ces lignées éteintes pour hp76-myc, observés en IF, ne présentaient pas de caractères particuliers (taille, nombre, distribution dans la cellule) après 6 semaines de culture.

Il est prévu par la suite de faire des lignées stables « hp76null » à partir de la lignée HEK 293-EBNA non transfectée ; un moyen de criblage plus sensible, comme la RT-PCR, sera utilisé pour sélectionner les clones n'exprimant plus d'ARNm hp76.

## **4. Discussion**

### **4. 1. Extinction de l'expression de hp76**

L'expression de hp76-myc a été éteinte sur une longue durée (six semaines) grâce à des plasmides commerciaux codant pour des shRNA spécifiques de l'ARNm de hp76. Cependant, aucun grossissement des lysosomes n'a été observé, probablement à cause de la lignée choisie pour ce premier criblage, à savoir les lignées 293/hp76-myc, qui surexpriment hp76-myc. Si p76 est une phospholipase lysosomale, on s'attendrait, après plusieurs semaines ou mois de culture des cellules « hp76-null », à observer une accumulation de phospholipides non dégradés, entraînant des lysosomes élargis. Cependant, ce phénotype ne sera observé que dans le cas où il n'existe pas une autre activité capable de compenser, même partiellement, l'absence de p76. Les activités redondantes sont fréquentes dans de nombreux mécanismes cellulaires en général, et il est illustré en particulier parmi les protéines lysosomales, par exemple, LAMP-1 et LAMP-2, les cathepsines. De plus, dans le cas de p76, il existe une protéine humaine qui pourrait jouer ce rôle : la protéine hypothétique LOC79887 (ou FLJ22662), qui a 33 % d'identité et 48 % de similarité de séquence avec hp76 ; les résidus identiques étant répartis sur toute la séquence. Cette protéine a été identifiée dans l'étude protéomique des protéines M6P de cerveau humain (Sleat et al., 2005). Un seul glycopeptide porteur de M6P a été identifié sur cette protéine (Sleat et al., 2006b).

Ainsi, nous avons également abordé la fonction de p76 *in vitro*, en recherchant une activité de type phospholipase B ou A acide. En effet, p76 présente une homologie de séquence significative avec la phospholipase B de *D. discoideum* (Dd-PLB).

### **4. 2. Production et purification de hp76**

Un questionnement récurrent pendant ce travail de thèse a concerné la source de hp76-myc et les quantités d'échantillon à utiliser pour les tests. A partir de lignées transfectées de manière stable et surexprimant hp76-myc, nous pouvions travailler soit sur le surnageant de culture contenant la protéine sécrétée, soit sur des fractions solubles, contenant la protéine intracellulaire. La purification du surnageant de culture de cellules 293/hp76-myc sur la colonne IMAC d'ion cobalt nous a permis de travailler avec hp76-myc presque pure, présente majoritairement sous sa forme précurseur à 80 kDa et sous sa forme clivée en deux chaînes de 50 et 32 kDa. Il est possible que seule la forme clivée soit active. Dans ce cas, la



concentration de la protéine clivée est bien inférieure à celle estimée pour le précurseur, qui est de 150 µg/mL approximativement. La fraction soluble offrait ainsi de meilleures chances de contenir la forme active de hp76. De plus, si hp76 a besoin d'un co-facteur soluble pour son activité, il pouvait être présent dans ce mélange complexe de protéines.

Par ailleurs, il est possible que l'étiquette myc-His<sub>6</sub> gêne la maturation ou l'activité de hp76-myc, bien que de nombreuses hydrolases lysosomales clonées avec une étiquette soient tout de même actives (Baker et al., 1998; Hiraoka et al., 2002). Pour la suite de ce travail, une nouvelle lignée de cellules HEK 293-EBNA a été établie, qui exprime hp76 sans étiquette.

#### **4. 3. Aucune activité phospholipase A n'a pu être détectée avec hp76**

Dans un premier temps, nous avons mis en place un test simple pour mettre en évidence une activité d'hydrolyse des phospholipides : des liposomes ou des micelles mixtes de phospholipides sont incubés avec hp76 recombinante, puis les lipides sont extraits et le profil des phospholipides incubés avec hp76 est comparé à ceux des contrôles, par CCM. Cette stratégie a été choisie d'une part, pour prendre la technique en main et d'autre part, pour sonder si, de manière évidente, un échantillon renfermant hp76 présentait une activité phospholipase. Les auteurs ayant identifié la Dd-PLB la décrivent comme étant « très active » (Morgan et al., 2004). Lorsque nous avons réalisés ces tests, le résultat était toujours négatif : les produits séparés dans les échantillons contenant hp76 ont toujours été identiques à ceux du contrôle « mock ».

Ensuite, pour avoir un test d'activité plus sensible, nous avons utilisé des substrats fluorescents dérivés de la phosphatidylcholine, en suivant des protocoles décrits dans la littérature. Ces tests fonctionnent bien en présence d'un contrôle positif, la PLA2pp. Avec le test en NBD-PC, aucune différence dans l'augmentation de la fluorescence n'a été détectée entre les fractions solubles « mock » et hp76-myc. Avec le test en bis-BODIPY PC, nos résultats indiquent qu'une activité de type phospholipase A acide contaminante subsiste dans le surnageant de culture issu de 293/hp76-myc et 293/mock malgré leur purification sur la colonne IMAC d'ion cobalt.

Les tests d'activités de phospholipases sont connus pour être assez difficiles à mettre en œuvre, car la forme du substrat est primordiale pour l'activité. Tous les paramètres tels que les proportions des différents phospholipides qui constituent la membrane, leur charge, l'environnement salin et le pH, la présence de détergent peuvent influencer de manière importante l'activité. Nous avons vu que les vésicules intraluminales arrivant de la voie

endocytaire avec les protéines et lipides à dégrader sont chargées négativement du fait de la présence en LBPA, un autre phospholipide particulier, chargé négativement. Il serait judicieux de tester des liposomes de composition différentes, chargés négativement. Certains protocoles de la littérature tiennent compte de ce critère pour la caractérisation des hydrolases acides (Hepbildikler et al., 2002; Robinson and Waite, 1983; Wilkening et al., 1998).

#### **4. 4. hp76-myc lie la cardiolipine**

Nous avons testé la liaison de hp76-myc à différents lipides par des expériences de fat blot et nous avons ainsi observé que hp76-myc se liait à la cardiolipine. Ce résultat nous incite à persévérer dans la recherche d'une activité de type phospholipase pour hp76.

La cardiolipine est un phospholipide présent dans les membranes bactériennes (dans la membrane interne des bactéries Gram-) et, chez les mammifères, elle est exclusivement présente dans la membrane interne des mitochondries (Hatch, 1998). Ses chaînes d'acide gras sont connues pour être parmi les plus insaturées de l'ensemble des phospholipides cellulaires, et cela contribue à la bonne fonction respiratoire des mitochondries (Schlame et al., 1999). Par ailleurs, elle est associée avec le cytochrome c dans la membrane interne mitochondriale : son état de peroxydation jouerait un rôle dans la libération du cytochrome c dans le cytosol, dans l'apoptose médiée par la voie intrinsèque mitochondriale (Garrido et al., 2006).

La liaison préférentielle de hp76-myc à la cardiolipine extraite de *E. coli* et à la cardiolipine synthétique (par rapport à la cardiolipine extraite de mitochondries, provenant de cœur de bœuf) semble indiquer une meilleure affinité de hp76-myc pour les cardiolipine à chaînes d'acides gras courtes (inférieures à 16 atomes de carbones) et saturées. Dans l'étude de la Dd-PLB, Morgan et al. ont observé que son activité était plus grande sur des PC à chaînes courtes. Cette activité a d'ailleurs été mesurée avec de la phosphatidylcholine di-décanoyl (C10).

L'affinité de hp76-myc pour la cardiolipine de *E. coli* peut suggérer un rôle de cette protéine dans la dégradation lysosomale des cardiolipides bactériens. Il existe par exemple dans les macrophages une activité phospholipase A2 lysosomale qui hydrolyse la cardiolipine des mycobactéries en lysocardiolipine, mais la protéine responsable de cette activité n'a pas encore été identifiée (Fischer et al., 2001). Cependant, on pourrait s'attendre à ce qu'une telle protéine soit plus spécifique des cellules de l'immunité, ce qui n'est pas le cas de hp76. Le fait qu'on observe une très faible liaison de hp76-myc à la cardiolipine extraite de mitochondries (de cœur de bœuf) sur fat blot n'exclut toutefois pas que hp76 puisse agir sur la cardiolipine

des mitochondries dans des conditions physiologiques, notamment lors du processus d'autophagie, qui est ubiquitaire.

Dans la littérature, des activités phospholipases lysosomales ayant une activité sur la cardiolipine sont effectivement décrites, mais les protéines responsables de cette activité ne sont pas encore identifiées (Fischer et al., 2001; Hostetler et al., 1982; Huterer et al., 1993; Piret et al., 2005). Il est stimulant de penser que p76 est peut-être l'une d'elles, même si nos tests se sont avérés infructueux jusqu'ici.

## **CONCLUSION ET PERSPECTIVES**



## Conclusion et perspectives

### I. Conclusion

Depuis que la protéine humaine p76 a été identifiée en 2000 dans un échantillon de protéines M6P issues de cellules U937 et MCF7 et purifiées sur une colonne d'affinité de sCI-MPR, ce travail de thèse a permis de déterminer de nombreuses caractéristiques biochimiques et la localisation subcellulaire de cette protéine.

Nous avons montré que les N-glycosylations présentes sur le précurseur de hp76 de U937 sont au nombre de six, avec une hétérogénéité sur un des trois sites situés sur le fragment C-terminal de 45 kDa. De plus, hp76 de U937 porte effectivement des sucres M6P parmi ses N-glycosylations.

Nous avons observé une maturation du précurseur de 76 kDa, pour la forme murine et pour la forme humaine de p76 :

mp76 subit une première étape de maturation générant un fragment C-terminal de 40 kDa, détecté dans les sécrétions de fibroblastes de souris. Lors d'une deuxième étape de maturation, ce fragment est clivé en un fragment C-terminal de 27 kDa, que nous avons nommé mp27. Ce fragment, qui est exclusivement intracellulaire, est retrouvé dans divers échantillons : lysats de cellules surexprimant mp76, extraits de cerveau purifiés sur sCI-MPR immobilisé, et fractions subcellulaires de foie de souris.

En ce qui concerne hp76, l'analyse de la protéine hp76-myc recombinante sécrétée a montré qu'après la coupure du peptide signal entre les résidus 41 et 42, le précurseur de hp76-myc est clivé entre les résidus 243 et 244. Cette forme de hp76-myc maturée est alors un hétérodimère, formé de deux chaînes associées entre elles par une liaison non covalente, l'une de 32 kDa N-terminale, et l'autre de 50 kDa C-terminale. Une coupure similaire est observée pour hp76 présente dans les protéines M6P purifiées à partir de sécrétions de cellules U937, la chaîne C-terminale apparaissant alors sous la forme d'un doublet à 45 kDa.

La maturation protéolytique de hp76-myc intracellulaire est complexe, et les variations observées entre lignées cellulaires ne nous permettent pas de proposer un schéma de maturation pour hp76.

La localisation lysosomale de p76 a été montrée par immunofluorescence et par des fractionnements subcellulaires de foie de souris.

Par immunofluorescence, nous avons observé une colocalisation extensive de hp76 et mp76 surexprimées dans des cellules HeLa avec les marqueurs lysosomaux LAMP et cathepsine D. La distribution intracellulaire de mp76 endogène a été étudiée grâce à des fractionnements subcellulaires réalisés sur du foie de souris, en collaboration avec le laboratoire du Pr Jadot. Dans un fractionnement subcellulaire total obtenu par centrifugations différentielles, le fragment C-terminal de mp76, mp27, est détecté dans les fractions mitochondriales lourdes et légères (M et L), dans une proportion caractéristique des lysosomes. De même, lorsqu'une fraction ML enrichie en lysosomes est soumise à une centrifugation isopycnique dans un gradient de densité linéaire, la distribution de mp27 dans ce gradient est superposable à celle des hydrolases lysosomales. Une expérience classique de modification de la densité des lysosomes par injection de Triton WR-1339 aux souris nous a apporté une preuve supplémentaire de la localisation lysosomale de p76, car mp27 subit alors le même déplacement de densité d'équilibre que les marqueurs des lysosomes. Une dernière expérience corrobore ce fait : lorsque des lysosomes sont soumis à des chocs osmotiques de force croissante, mp27 est relarguée dans la fraction soluble, de manière tout à fait comparable aux hydrolases lysosomales.

Un fragment N-terminal de mp76 de 33 kDa est détecté dans les gradients de densité réalisés avec les fractions ML de souris traitées au Triton WR-1339. Ce fragment est également latent ; il est libéré dans la fraction soluble lorsque des lysosomes sont soumis à des chocs osmotiques. Dans ces deux expériences, il présente un comportement similaire aux hydrolases lysosomales. Malheureusement, nous ne pouvons affirmer avec certitude son existence, car nous n'avons pas pu le détecter dans les échantillons préparés à partir de souris normales.

L'existence d'une homologie de séquence entre p76 et une phospholipase B nouvellement décrite de l'amibe *D. discoideum* nous a orienté vers la recherche d'une activité de type phospholipase A ou B, en milieu acide. Une fonction enzymatique serait cohérente pour une nouvelle protéine lysosomale soluble, d'autant que des activités phospholipases lysosomales ont été caractérisées biochimiquement et que les gènes codants pour ces activités n'ont pas encore été clonés.

Pour effectuer ces tests fonctionnels, nous avons utilisé des sources variées de hp76 : initialement des fractions solubles ou du surnageant de culture de cellules CHO/hp76-myc,

exprimant de très faibles quantités de hp76-myc, puis des fractions solubles ou du surnageant de culture de cellules 293/hp76-myc. Le surnageant a parfois été purifié sur une colonne qui retient l'étiquette His<sub>6</sub> de hp76-myc.

Les tests ont d'abord consisté à incuber p76 avec des phospholipides sous forme de liposomes ou de micelles mixtes, puis à analyser les produits de la réaction en chromatographie en couche mince. Puis, pour être plus sensible, nous avons utilisé des substrats des PLA analogues fluorescents de la phosphatidylcholine, en micelles mixtes ou en liposomes. Le clivage de ces composés par des phospholipases A est suivi par spectrofluorimétrie. Malheureusement, aucune activité de ce type n'a pu être décelée de manière spécifique dans les échantillons contenant hp76-myc par rapport à nos contrôles « mock ».

Enfin, nous avons cherché à éteindre l'expression de hp76 par la transfection de plasmides de shRNA dans des cellules 293/hp76-myc. Malgré l'extinction du signal hp76 observée par immunofluorescence, des lysosomes de ces cellules ne présentent pas de différences morphologiques, après six semaines de culture.

Pour voir si hp76 pouvait lier des phospholipides, des tests par fat blot ont été réalisés. Ainsi, nous avons montré que hp76-myc liait la cardiolipine, avec une préférence pour la cardiolipine de *E. coli*, et la cardiolipine synthétique. Ce résultat est une piste encourageante pour poursuivre l'hypothèse que hp76 est une phospholipase lysosomale.

## II . Perspectives

Pour la poursuite de l'étude de hp76, certains outils pourraient être améliorés, comme la production et la purification de hp76, ainsi que l'établissement des lignées stables hp76null.

La production de hp76 sera réalisée avec une nouvelle lignée de cellules 293/hp76, et non plus les cellules 293/hp76-myc. Si cependant ce système ne produit pas encore assez de hp76, il pourra être envisagé de changer de système de production, et d'exprimer hp76 dans la levure *P. pastoris*, dans des cellules d'insectes, voire de réaliser une traduction *in vitro*. La purification de hp76 pourrait être effectuée par deux étapes de chromatographie successives : une colonne d'affinité avec du sCI-MPR immobilisé et une colonne échangeuse d'anions. Cette colonne-ci avait permis de purifier efficacement hp76-myc, sous sa forme précurseur et sous sa forme maturée avec les deux fragments associés.

Cette source de hp76 purifiée pourrait alors être utilisée pour confirmer sa liaison à la cardiolipine, en fat blot, mais également par d'autres techniques comme des tests de liaison aux liposomes (« liposome binding assay ») (Patki et al., 1997; Zhao et al., 2003). Il s'agit de mettre en présence hp76 purifiée avec des liposomes composés de différents phospholipides.



Après centrifugation des liposomes, si hp76 se lie effectivement avec les phospholipides, elle devrait se retrouver dans le culot, et rester dans le surnageant dans le cas contraire. Par ailleurs, si de grandes quantités de hp76 sont purifiées, des tests fonctionnels *in vitro* pourraient être envisagés à nouveau, en testant de manière systématique des liposomes de composition différentes, avec des proportions variables de phospholipides chargés négativement (cardiolipine, acide phosphatidique, phosphatidylserine, phosphatidylinositol, phosphatidylglycérol). L'analyse des produits de la réaction pourrait se faire à nouveau par CCM, mais il pourrait également être envisagé de doser les acides gras libérés, soit par chromatographie en phase gazeuse, soit par l'utilisation de l'ADIFAB (pour Acrylodan labelled Intestinal Fatty Acid Binding protein), une protéine couplée à un fluorochrome dont la longueur d'onde d'émission de fluorescence est déplacée de 432 à 505 nm lorsqu'elle fixe des acides gras. La mesure des rapports de fluorescence entre les deux longueurs d'onde permet alors de déterminer la concentration en acides gras (Richieri and Kleinfeld, 1995).

Prochainement, des lignées de cellules 293/ hp76null seront établies à partir de cellules HEK 293-EBNA normales, transfectées de manière stable avec un plasmide shRNA spécifique de hp76, et dont l'extinction sera confirmée par RT-PCR. Il serait préférable d'avoir une lignée dans laquelle l'extinction est totale, pour observer plus rapidement un phénotype remarquable. Même si p76 n'est pas une phospholipase, il est possible que son extinction entraîne des modifications des lysosomes sur l'échelle de quelques mois. La taille et le nombre des lysosomes pourraient être observée en IF, voire même en microscopie électronique pour visualiser le matériel renfermé dans les lysosomes des cellules 293/hp76null. Il serait également envisageable d'analyser le comportement des lysosomes de ces lignées par les techniques de fractionnements subcellulaires, afin de voir si certaines de leurs propriétés sont altérées (par exemple, leur densité, la propriété de latence des hydrolases) (Hamer and Jadot, 2005).

Une autre étude envisageable à partir des lignées 293/hp76null serait la comparaison des profils des lipides cellulaires, en particulier des phospholipides. Il serait intéressant de voir si les profils phospholipidiques seraient affectés par l'absence de p76. Pour marquer les phospholipides, les cellules seraient alimentées avec du palmitate radiomarké ( $^3\text{H}$ ), puis les lipides seraient extraits et analysés par chromatographie en couche mince selon les protocoles décrits dans la littérature (Andrieu et al., 1995; Plo et al., 2000).

Une autre solution serait de construire une lignée de souris dont le gène codant pour hp76 serait invalidé. Il serait intéressant d'observer si ces souris sont viables, et si elles le sont, observer si elles développent les symptômes d'une maladie de surcharge lysosomale, avec

cependant une possibilité pour éventualité d'avoir une activité compensatrice. Un tel projet est déjà en cours dans un laboratoire concurrent (Deuschl et al., 2006).

La fonction de p76 pourrait également être mieux cernée en recherchant une ou des protéines partenaires qui pourraient jouer le rôle de « cofacteur », à l'instar des saposines A, B, C et D et l'activateur GM2. Ces protéines activatrices permettent aux hydrolases lysosomales ( $\beta$ -hexosaminidase,  $\alpha$ -galactosidase, etc.) d'avoir accès aux résidus glucidiques des glycosphingolipides qu'elles clivent (Kolter and Sandhoff, 2005). Pour identifier un partenaire protéique, les techniques classiquement utilisées sont le double hybride, le « pull-down », l'immunoprécipitation. La capacité de nos anticorps à immunoprécipiter p76 a été testée, mais aucun de nos anticorps ne s'est avéré très efficace. L'anticorps Nhp76Ab ne parvient à immunoprécipiter hp76-myc qu'à partir d'un surnageant de culture de cellules 293/hp76-myc ; il ne fonctionne plus sur un lysat de ces mêmes cellules.

Le fait que hp76 est peut-être une phospholipase lysosomale qui dégrade la cardiolipine ouvre principalement la voie vers deux pistes fonctionnelles, qui sont la dégradation des lipides bactériens phagocytés et/ou l'autophagie des mitochondries.

Ces hypothèses pourraient être testées en analysant le taux d'expression de l'ARNm et/ou de la protéine hp76 dans des cellules U937 différenciées en macrophages par des esters de phorbols, puis activées par *E. coli*, ou d'autres types de bactéries (Caron et al., 1994). Le rôle éventuel de hp76 dans l'autophagie des mitochondries pourrait être testé avec les cellules 293/hp76 et les cellules 293/hp76null, mises dans milieu sans sérum pour induire l'autophagie. Elles seraient ensuite observées par IF avec un triple marquage anti-hp76, anti-LC3 pour marquer les vacuoles d'autophagie et un anticorps anti-protéine mitochondriale. Si hp76 joue effectivement un rôle dans la dégradation de la cardiolipine des mitochondries, un défaut de dégradation des mitochondries devrait être observable en IF dans les lignées 293/hp76null, qui devraient avoir dans leur cytoplasme un nombre plus important de vacuoles d'autophagie.

La poursuite de la caractérisation de p76, une nouvelle protéine lysosomale, contribuera à élargir la compréhension du lysosome et surtout, si elle est une phospholipase, elle permettrait également de mieux comprendre le catabolisme des phospholipides, encore peu connu à ce jour.



## **BIBLIOGRAPHIE**



## BIBLIOGRAPHIE

- Abe, A., Hiraoka, M., Wild, S., Wilcoxon, S.E., Paine, R., 3rd and Shayman, J.A. (2004) Lysosomal phospholipase A2 is selectively expressed in alveolar macrophages. *J Biol Chem*, **279**, 42605-42611.
- Abe, A. and Shayman, J.A. (1998) Purification and characterization of 1-O-acylceramide synthase, a novel phospholipase A2 with transacylase activity. *J Biol Chem*, **273**, 8467-8474.
- Aguilar, R.C. and Wendland, B. (2003) Ubiquitin: not just for proteasomes anymore. *Curr Opin Cell Biol*, **15**, 184-190.
- Ahlberg, J., Marzella, L. and Glaumann, H. (1982) Uptake and degradation of proteins by isolated rat liver lysosomes. Suggestion of a microautophagic pathway of proteolysis. *Lab Invest*, **47**, 523-532.
- Amidon, B., Schmitt, J.D., Thuren, T., King, L. and Waite, M. (1995) Biosynthetic conversion of phosphatidylglycerol to sn-1:sn-1' bis(monoacylglycerol) phosphate in a macrophage-like cell line. *Biochemistry*, **34**, 5554-5560.
- Andrejewski, N., Punnonen, E.L., Guhde, G., Tanaka, Y., Lullmann-Rauch, R., Hartmann, D., von Figura, K. and Saftig, P. (1999) Normal lysosomal morphology and function in LAMP-1-deficient mice. *J Biol Chem*, **274**, 12692-12701.
- Andrews, N.W. (2005) Membrane resealing: synaptotagmin VII keeps running the show. *Sci STKE*, **2005**, pe19.
- Andrieu, N., Salvayre, R., Jaffrezou, J.P. and Levade, T. (1995) Low temperatures and hypertonicity do not block cytokine-induced stimulation of the sphingomyelin pathway but inhibit nuclear factor-kappa B activation. *J Biol Chem*, **270**, 24518-24524.
- Appelmans, F. and De Duve, C. (1955) Tissue fractionation studies. 3. Further observations on the binding of acid phosphatase by rat-liver particles. *Biochem J*, **59**, 426-433.
- Appelmans, F., Wattiaux, R. and De Duve, C. (1955) Tissue fractionation studies. 5. The association of acid phosphatase with a special class of cytoplasmic granules in rat liver. *Biochem J*, **59**, 438-445.

- Baker, K.P., Baron, W.F., Henzel, W.J. and Spencer, S.A. (1998) Molecular cloning and characterization of human and murine DNase II. *Gene*, **215**, 281-289.
- Barrett, A.J. (1970) Cathepsin D. Purification of isoenzymes from human and chicken liver. *Biochem J*, **117**, 601-607.
- Beaufay, H. (1972) Methods for the isolation of lysosomes. In Dingle, J.T. (ed.), *Lysosomes. A laboratory handbook*. North-Holland, Amsterdam, pp. 1-44.
- Beaufay, H., Jacques, P., Baudhuin, P., Sellinger, O.Z., Berthet, J. and de Duve, C. (1964) Tissue fractionation studies. 18. Resolution of mitochondrial fractions from rat liver into three distinct populations of cytoplasmic particles by means of density equilibration in various gradients. *Biochem J*, **92**, 184-205.
- Bligh, E.G. and Dyer, W.J. (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol*, **37**, 911-917.
- Bonifacino, J.S. and Rojas, R. (2006) Retrograde transport from endosomes to the trans-Golgi network. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **7**, 568-579.
- Bonifacino, J.S. and Traub, L.M. (2003) Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes. *Annu Rev Biochem*, **72**, 395-447.
- Boonen, M., Hamer, I., Boussac, M., Delsaute, A.F., Flamion, B., Garin, J. and Jadot, M. (2006) Intracellular localization of p40, a protein identified in a preparation of lysosomal membranes. *Biochem J*, **395**, 39-47.
- Borensztajn, J., Rone, M.S. and Kotlar, T.J. (1976) The inhibition in vivo of lipoprotein lipase (clearing-factor lipase) activity by triton WR-1339. *Biochem J*, **156**, 539-543.
- Borgonovo, B., Cocucci, E., Racchetti, G., Podini, P., Bachi, A. and Meldolesi, J. (2002) Regulated exocytosis: a novel, widely expressed system. *Nat Cell Biol*, **4**, 955-962.
- Borner, G.H., Harbour, M., Hester, S., Lilley, K.S. and Robinson, M.S. (2006) Comparative proteomics of clathrin-coated vesicles. *J Cell Biol*, **175**, 571-578.
- Bright, N.A., Gratian, M.J. and Luzio, J.P. (2005) Endocytic delivery to lysosomes mediated by concurrent fusion and kissing events in living cells. *Curr Biol*, **15**, 360-365.
- Brodsky, F.M., Chen, C.Y., Knuehl, C., Towler, M.C. and Wakeham, D.E. (2001) Biological basket weaving: formation and function of clathrin-coated vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **17**, 517-568.
- Brown, M.S., Anderson, R.G. and Goldstein, J.L. (1983) Recycling receptors: the round-trip itinerary of migrant membrane proteins. *Cell*, **32**, 663-667.

- Brunk, U.T., Dalen, H., Roberg, K. and Hellquist, H.B. (1997) Photo-oxidative disruption of lysosomal membranes causes apoptosis of cultured human fibroblasts. *Free Radic Biol Med*, **23**, 616-626.
- Bucci, C., Thomsen, P., Nicoziani, P., McCarthy, J. and van Deurs, B. (2000) Rab7: a key to lysosome biogenesis. *Mol Biol Cell*, **11**, 467-480.
- Buckmaster, M.J., Ferris, A.L. and Storrie, B. (1988) Effects of pH, detergent and salt on aggregation of Chinese-hamster-ovary-cell lysosomal enzymes. *Biochem J*, **249**, 921-923.
- Buhling, F., Gerber, A., Hackel, C., Kruger, S., Kohnlein, T., Bromme, D., Reinhold, D., Ansorge, S. and Welte, T. (1999) Expression of cathepsin K in lung epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*, **20**, 612-619.
- Campbell, M.J. (1995) Lipofection reagents prepared by a simple ethanol injection technique. *Biotechniques*, **18**, 1027-1032.
- Cantor, A.B., Baranski, T.J. and Kornfeld, S. (1992) Lysosomal enzyme phosphorylation. II. Protein recognition determinants in either lobe of procathepsin D are sufficient for phosphorylation of both the amino and carboxyl lobe oligosaccharides. *J Biol Chem*, **267**, 23349-23356.
- Capony, F., Rougeot, C., Montcourrier, P., Cavailles, V., Salazar, G. and Rochefort, H. (1989) Increased secretion, altered processing, and glycosylation of pro-cathepsin D in human mammary cancer cells. *Cancer Res*, **49**, 3904-3909.
- Caron, E., Liautard, J.P. and Kohler, S. (1994) Differentiated U937 cells exhibit increased bactericidal activity upon LPS activation and discriminate between virulent and avirulent *Listeria* and *Brucella* species. *J Leukoc Biol*, **56**, 174-181.
- Cerny, J., Feng, Y., Yu, A., Miyake, K., Borgonovo, B., Klumperman, J., Meldolesi, J., McNeil, P.L. and Kirchhausen, T. (2004) The small chemical vacuolin-1 inhibits Ca(2+)-dependent lysosomal exocytosis but not cell resealing. *EMBO Rep*, **5**, 883-888.
- Chavrier, P., Parton, R.G., Hauri, H.P., Simons, K. and Zerial, M. (1990) Localization of low molecular weight GTP binding proteins to exocytic and endocytic compartments. *Cell*, **62**, 317-329.
- Chen, J.W., Dodia, C., Feinstein, S.I., Jain, M.K. and Fisher, A.B. (2000) 1-Cys peroxiredoxin, a bifunctional enzyme with glutathione peroxidase and phospholipase A2 activities. *J Biol Chem*, **275**, 28421-28427.



- Cheruku, S.R., Xu, Z., Dutia, R., Lobel, P. and Storch, J. (2006) Mechanism of cholesterol transfer from the Niemann-Pick type C2 protein to model membranes supports a role in lysosomal cholesterol transport. *J Biol Chem*, **281**, 31594-31604.
- Christensen, E.I. and Birn, H. (2002) Megalin and cubilin: multifunctional endocytic receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **3**, 256-266.
- Ciron, C., Desmaris, N., Colle, M.A., Raoul, S., Joussemet, B., Verot, L., Ausseil, J., Froissart, R., Roux, F., Cherel, Y., Ferry, N., Lajat, Y., Schwartz, B., Vanier, M.T., Maire, I., Tardieu, M., Moullier, P. and Heard, J.M. (2006) Gene therapy of the brain in the dog model of Hurler's syndrome. *Ann Neurol*, **60**, 204-213.
- Cuervo, A.M. and Dice, J.F. (1998) Lysosomes, a meeting point of proteins, chaperones, and proteases. *J Mol Med*, **76**, 6-12.
- Damm, E.M., Pelkmans, L., Kartenbeck, J., Mezzacasa, A., Kurzchalia, T. and Helenius, A. (2005) Clathrin- and caveolin-1-independent endocytosis: entry of simian virus 40 into cells devoid of caveolae. *J Cell Biol*, **168**, 477-488.
- Davies, J.P., Chen, F.W. and Ioannou, Y.A. (2000) Transmembrane molecular pump activity of Niemann-Pick C1 protein. *Science*, **290**, 2295-2298.
- de Duve, C. (2005) The lysosome turns fifty. *Nat Cell Biol*, **7**, 847-849.
- de Duve, C., Pressman, B.C., Gianetto, R., Wattiaux, R. and Appelmans, F. (1955) Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue. *Biochem J*, **60**, 604-617.
- Deiss, L.P., Galinka, H., Berissi, H., Cohen, O. and Kimchi, A. (1996) Cathepsin D protease mediates programmed cell death induced by interferon-gamma, Fas/APO-1 and TNF-alpha. *Embo J*, **15**, 3861-3870.
- Delagebeaudeuf, C., Gassama-Diagne, A., Nauze, M., Ragab, A., Li, R.Y., Capdevielle, J., Ferrara, P., Fauvel, J. and Chap, H. (1998) Ectopic epididymal expression of guinea pig intestinal phospholipase B. Possible role in sperm maturation and activation by limited proteolytic digestion. *J Biol Chem*, **273**, 13407-13414.
- Desjardins, M. (1995) Biogenesis of phagolysosomes: the 'kiss and run' hypothesis. *Trends Cell Biol*, **5**, 183-186.
- Desjardins, M., Houde, M. and Gagnon, E. (2005) Phagocytosis: the convoluted way from nutrition to adaptive immunity. *Immunol Rev*, **207**, 158-165.
- Desnick, R.J. and Schuchman, E.H. (2002) Enzyme replacement and enhancement therapies: lessons from lysosomal disorders. *Nat Rev Genet*, **3**, 954-966.

- Dessen, A., Tang, J., Schmidt, H., Stahl, M., Clark, J.D., Seehra, J. and Somers, W.S. (1999) Crystal structure of human cytosolic phospholipase A2 reveals a novel topology and catalytic mechanism. *Cell*, **97**, 349-360.
- Deuschl, F., Kollmann, K., von Figura, K. and Lubke, T. (2006) Molecular characterization of the hypothetical 66.3-kDa protein in mouse: lysosomal targeting, glycosylation, processing and tissue distribution. *FEBS Lett*, **580**, 5747-5752.
- Diagne, A., Mitjavila, S., Fauvel, J., Chap, H. and Douste-Blazy, L. (1987) Intestinal absorption of ester and ether glycerophospholipids in guinea pig. Role of a phospholipase A2 from brush border membrane. *Lipids*, **22**, 33-40.
- Einstein, R. and Gabel, C.A. (1991) Cell- and ligand-specific dephosphorylation of acid hydrolases: evidence that the mannose 6-phosphatase is controlled by compartmentalization. *J Cell Biol*, **112**, 81-94.
- Eskelinen, E.L. (2005) Maturation of autophagic vacuoles in Mammalian cells. *Autophagy*, **1**, 1-10.
- Eskelinen, E.L., Schmidt, C.K., Neu, S., Willenborg, M., Fuertes, G., Salvador, N., Tanaka, Y., Lullmann-Rauch, R., Hartmann, D., Heeren, J., von Figura, K., Knecht, E. and Saftig, P. (2004) Disturbed cholesterol traffic but normal proteolytic function in LAMP-1/LAMP-2 double-deficient fibroblasts. *Mol Biol Cell*, **15**, 3132-3145.
- Evans, C.J. and Aguilera, R.J. (2003) DNase II: genes, enzymes and function. *Gene*, **322**, 1-15.
- Faust, P.L., Chirgwin, J.M. and Kornfeld, S. (1987) Renin, a secretory glycoprotein, acquires phosphomannosyl residues. *J Cell Biol*, **105**, 1947-1955.
- Felbor, U., Kessler, B., Mothes, W., Goebel, H.H., Ploegh, H.L., Bronson, R.T. and Olsen, B.R. (2002) Neuronal loss and brain atrophy in mice lacking cathepsins B and L. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 7883-7888.
- Feng, L., Manabe, K., Shope, J.C., Widmer, S., DeWald, D.B. and Prestwich, G.D. (2002) A real-time fluorogenic phospholipase A(2) assay for biochemical and cellular activity measurements. *Chem Biol*, **9**, 795-803.
- Fischer, K., Chatterjee, D., Torrelles, J., Brennan, P.J., Kaufmann, S.H. and Schaible, U.E. (2001) Mycobacterial lysocardiolipin is exported from phagosomes upon cleavage of cardiolipin by a macrophage-derived lysosomal phospholipase A2. *J Immunol*, **167**, 2187-2192.

- Fisher, A.B., Dodia, C., Feinstein, S.I. and Ho, Y.S. (2005) Altered lung phospholipid metabolism in mice with targeted deletion of lysosomal-type phospholipase A2. *J Lipid Res*, **46**, 1248-1256.
- Ford, M.G., Mills, I.G., Peter, B.J., Vallis, Y., Praefcke, G.J., Evans, P.R. and McMahon, H.T. (2002) Curvature of clathrin-coated pits driven by epsin. *Nature*, **419**, 361-366.
- Forgac, M. (1999) Structure and properties of the vacuolar (H<sup>+</sup>)-ATPases. *J Biol Chem*, **274**, 12951-12954.
- Fotin, A., Cheng, Y., Sliz, P., Grigorieff, N., Harrison, S.C., Kirchhausen, T. and Walz, T. (2004) Molecular model for a complete clathrin lattice from electron cryomicroscopy. *Nature*, **432**, 573-579.
- Frantz, I.D., Jr. and Hinkelman, B.T. (1955) Acceleration of hepatic cholesterol synthesis by triton WR-1339. *J Exp Med*, **101**, 225-232.
- Friedrichs, B., Tepel, C., Reinheckel, T., Deussing, J., von Figura, K., Herzog, V., Peters, C., Saftig, P. and Brix, K. (2003) Thyroid functions of mouse cathepsins B, K, and L. *J Clin Invest*, **111**, 1733-1745.
- Frustaci, A., Chimenti, C., Ricci, R., Natale, L., Russo, M.A., Pieroni, M., Eng, C.M. and Desnick, R.J. (2001) Improvement in cardiac function in the cardiac variant of Fabry's disease with galactose-infusion therapy. *N Engl J Med*, **345**, 25-32.
- Fukuda, M. (1991) Lysosomal membrane glycoproteins. Structure, biosynthesis, and intracellular trafficking. *J Biol Chem*, **266**, 21327-21330.
- Furst, W. and Sandhoff, K. (1992) Activator proteins and topology of lysosomal sphingolipid catabolism. *Biochim Biophys Acta*, **1126**, 1-16.
- Futerman, A.H. and van Meer, G. (2004) The cell biology of lysosomal storage disorders. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **5**, 554-565.
- Gagnon, E., Duclos, S., Rondeau, C., Chevet, E., Cameron, P.H., Steele-Mortimer, O., Paiement, J., Bergeron, J.J. and Desjardins, M. (2002) Endoplasmic reticulum-mediated phagocytosis is a mechanism of entry into macrophages. *Cell*, **110**, 119-131.
- Gahl, W.A., Bashan, N., Tietze, F., Bernardini, I. and Schulman, J.D. (1982) Cystine transport is defective in isolated leukocyte lysosomes from patients with cystinosis. *Science*, **217**, 1263-1265.
- Garin, J., Diez, R., Kieffer, S., Dermine, J.F., Duclos, S., Gagnon, E., Sadoul, R., Rondeau, C. and Desjardins, M. (2001) The phagosome proteome: insight into phagosome functions. *J Cell Biol*, **152**, 165-180.

- Garrido, C., Galluzzi, L., Brunet, M., Puig, P.E., Didelot, C. and Kroemer, G. (2006) Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death Differ*, **13**, 1423-1433.
- Gassama-Diagne, A., Rogalle, P., Fauvel, J., Willson, M., Klaebe, A. and Chap, H. (1992) Substrate specificity of phospholipase B from guinea pig intestine. A glycerol ester lipase with broad specificity. *J Biol Chem*, **267**, 13418-13424.
- Geier, C., Kreysing, J., Boettcher, H., Pohlmann, R. and von Figura, K. (1992) Localization of lysosomal acid phosphatase mRNA in mouse tissues. *J Histochem Cytochem*, **40**, 1275-1282.
- Geuze, H.J., Stoorvogel, W., Strous, G.J., Slot, J.W., Bleekemolen, J.E. and Mellman, I. (1988) Sorting of mannose 6-phosphate receptors and lysosomal membrane proteins in endocytic vesicles. *J Cell Biol*, **107**, 2491-2501.
- Ghosh, P., Dahms, N.M. and Kornfeld, S. (2003) Mannose 6-phosphate receptors: new twists in the tale. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **4**, 202-212.
- Gieselmann, V., Hasilik, A. and von Figura, K. (1985) Processing of human cathepsin D in lysosomes in vitro. *J Biol Chem*, **260**, 3215-3220.
- Gieselmann, V., Pohlmann, R., Hasilik, A. and Von Figura, K. (1983) Biosynthesis and transport of cathepsin D in cultured human fibroblasts. *J Cell Biol*, **97**, 1-5.
- Glaumann, H., Ahlberg, J., Hultenby, K., Jansson, H., Mengarelli-Widholm, S. and Motakefi, A.M. (1989) Isolation and characterization of crinosomes--a subclass of secondary lysosomes. *Exp Mol Pathol*, **50**, 167-182.
- Glickman, J.N. and Kornfeld, S. (1993) Mannose 6-phosphate-independent targeting of lysosomal enzymes in I-cell disease B lymphoblasts. *J Cell Biol*, **123**, 99-108.
- Glickman, J.N., Morton, P.A., Slot, J.W., Kornfeld, S. and Geuze, H.J. (1996) The biogenesis of the MHC class II compartment in human I-cell disease B lymphoblasts. *J Cell Biol*, **132**, 769-785.
- Golabek, A.A., Kida, E., Walus, M., Kaczmarek, W., Michalewski, M. and Wisniewski, K.E. (2000) CLN3 protein regulates lysosomal pH and alters intracellular processing of Alzheimer's amyloid-beta protein precursor and cathepsin D in human cells. *Mol Genet Metab*, **70**, 203-213.
- Goldstein, J.L., Brown, M.S., Anderson, R.G., Russell, D.W. and Schneider, W.J. (1985) Receptor-mediated endocytosis: concepts emerging from the LDL receptor system. *Annu Rev Cell Biol*, **1**, 1-39.

- Grabowski, G.A., Gatt, S. and Horowitz, M. (1990) Acid beta-glucosidase: enzymology and molecular biology of Gaucher disease. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, **25**, 385-414.
- Griffiths, G. (1996) On vesicles and membrane compartments. *Protoplasma*, **195**, 37-58.
- Griffiths, G. and Gruenberg, J. (1991) The arguments for pre-existing early and late endosomes. *Trends Cell Biol*, **1**, 5-9.
- Gruenberg, J. (2001) The endocytic pathway: a mosaic of domains. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2**, 721-730.
- Gruenberg, J. and Maxfield, F.R. (1995) Membrane transport in the endocytic pathway. *Curr Opin Cell Biol*, **7**, 552-563.
- Guenette, R.S., Mooibroek, M., Wong, K., Wong, P. and Tenniswood, M. (1994) Cathepsin B, a cysteine protease implicated in metastatic progression, is also expressed during regression of the rat prostate and mammary glands. *Eur J Biochem*, **226**, 311-321.
- Guicciardi, M.E., Deussing, J., Miyoshi, H., Bronk, S.F., Svingen, P.A., Peters, C., Kaufmann, S.H. and Gores, G.J. (2000) Cathepsin B contributes to TNF-alpha-mediated hepatocyte apoptosis by promoting mitochondrial release of cytochrome c. *J Clin Invest*, **106**, 1127-1137.
- Haglund, K., Di Fiore, P.P. and Dikic, I. (2003) Distinct monoubiquitin signals in receptor endocytosis. *Trends Biochem Sci*, **28**, 598-603.
- Hamer, I. and Jadot, M. (2005) Endolysosomal transport of newly-synthesized cathepsin D in a sucrose model of lysosomal storage. *Exp Cell Res*, **309**, 284-295.
- Hannon, G.J. and Rossi, J.J. (2004) Unlocking the potential of the human genome with RNA interference. *Nature*, **431**, 371-378.
- Hasilik, A. and Neufeld, E.F. (1980) Biosynthesis of lysosomal enzymes in fibroblasts. Synthesis as precursors of higher molecular weight. *J Biol Chem*, **255**, 4937-4945.
- Hasilik, A., Waheed, A. and von Figura, K. (1981) Enzymatic phosphorylation of lysosomal enzymes in the presence of UDP-N-acetylglucosamine. Absence of the activity in I-cell fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun*, **98**, 761-767.
- Hatch, G.M. (1998) Cardiolipin: biosynthesis, remodeling and trafficking in the heart and mammalian cells (Review). *Int J Mol Med*, **1**, 33-41.
- Havelaar, A.C., Beerens, C.E., Mancini, G.M. and Verheijen, F.W. (1999) Transport of organic anions by the lysosomal sialic acid transporter: a functional approach towards the gene for sialic acid storage disease. *FEBS Lett*, **446**, 65-68.

- Hepbildikler, S.T., Sandhoff, R., Kolzer, M., Proia, R.L. and Sandhoff, K. (2002) Physiological substrates for human lysosomal beta -hexosaminidase S. *J Biol Chem*, **277**, 2562-2572.
- Herzog, V., Neumuller, W. and Holzmann, B. (1987) Thyroglobulin, the major and obligatory exportable protein of thyroid follicle cells, carries the lysosomal recognition marker mannose-6-phosphate. *Embo J*, **6**, 555-560.
- Hiraoka, M., Abe, A., Lu, Y., Yang, K., Han, X., Gross, R.W. and Shayman, J.A. (2006) Lysosomal phospholipase A2 and phospholipidosis. *Mol Cell Biol*, **26**, 6139-6148.
- Hiraoka, M., Abe, A. and Shayman, J.A. (2002) Cloning and characterization of a lysosomal phospholipase A2, 1-O-acylceramide synthase. *J Biol Chem*, **277**, 10090-10099.
- Hoflack, B., Fujimoto, K. and Kornfeld, S. (1987) The interaction of phosphorylated oligosaccharides and lysosomal enzymes with bovine liver cation-dependent mannose 6-phosphate receptor. *J Biol Chem*, **262**, 123-129.
- Hostetler, K.Y., Yazaki, P.J. and van den Bosch, H. (1982) Purification of lysosomal phospholipase A. Evidence for multiple isoenzymes in rat liver. *J Biol Chem*, **257**, 13367-13373.
- Huterer, S.J., Hostetler, K.Y., Gardner, M.F. and Wherrett, J.R. (1993) Lysosomal phosphatidylcholine: bis(monoacylglycero)phosphate acyltransferase: specificity for the sn-1 fatty acid of the donor and co-purification with phospholipase A1. *Biochim Biophys Acta*, **1167**, 204-210.
- Huttner, W.B. and Schmidt, A. (2000) Lipids, lipid modification and lipid-protein interaction in membrane budding and fission--insights from the roles of endophilin A1 and synaptophysin in synaptic vesicle endocytosis. *Curr Opin Neurobiol*, **10**, 543-551.
- Huynh, K.K., Eskelinen, E.L., Scott, C.C., Malevanets, A., Saftig, P. and Grinstein, S. (2007) LAMP proteins are required for fusion of lysosomes with phagosomes. *Embo J*, **26**, 313-324.
- Ioannou, Y.A., Bishop, D.F. and Desnick, R.J. (1992) Overexpression of human alpha-galactosidase A results in its intracellular aggregation, crystallization in lysosomes, and selective secretion. *J Cell Biol*, **119**, 1137-1150.
- Jadot, M., Dubois, F., Wattiaux-De Coninck, S. and Wattiaux, R. (1997) Supramolecular assemblies from lysosomal matrix proteins and complex lipids. *Eur J Biochem*, **249**, 862-869.

- Jadot, M., Lin, L., Sleat, D.E., Sohar, I., Hsu, M.S., Pintar, J., Dubois, F., Coninck, S.W., Wattiaux-De Coninck, S. and Lobel, P. (1999) Subcellular localization of mannose 6-phosphate glycoproteins in rat brain. *J Biol Chem*, **274**, 21104-21113.
- Janvier, K. and Bonifacino, J.S. (2005) Role of the endocytic machinery in the sorting of lysosome-associated membrane proteins. *Mol Biol Cell*, **16**, 4231-4242.
- Journet, A., Chapel, A., Kieffer, S., Louwagie, M., Luche, S. and Garin, J. (2000) Towards a human repertoire of monocytic lysosomal proteins. *Electrophoresis*, **21**, 3411-3419.
- Journet, A., Chapel, A., Kieffer, S., Roux, F. and Garin, J. (2002) Proteomic analysis of human lysosomes: application to monocytic and breast cancer cells. *Proteomics*, **2**, 1026-1040.
- Kabeya, Y., Mizushima, N., Ueno, T., Yamamoto, A., Kirisako, T., Noda, T., Kominami, E., Ohsumi, Y. and Yoshimori, T. (2000) LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *Embo J*, **19**, 5720-5728.
- Kagedal, K., Zhao, M., Svensson, I. and Brunk, U.T. (2001) Sphingosine-induced apoptosis is dependent on lysosomal proteases. *Biochem J*, **359**, 335-343.
- Kalatzis, V., Cherqui, S., Antignac, C. and Gasnier, B. (2001) Cystinosin, the protein defective in cystinosis, is a H(+)-driven lysosomal cystine transporter. *Embo J*, **20**, 5940-5949.
- Kalatzis, V., Nevo, N., Cherqui, S., Gasnier, B. and Antignac, C. (2004) Molecular pathogenesis of cystinosis: effect of CTNS mutations on the transport activity and subcellular localization of cystinosin. *Hum Mol Genet*, **13**, 1361-1371.
- Kegel, K.B., Kim, M., Sapp, E., McIntyre, C., Castano, J.G., Aronin, N. and DiFiglia, M. (2000) Huntingtin expression stimulates endosomal-lysosomal activity, endosome tubulation, and autophagy. *J Neurosci*, **20**, 7268-7278.
- Kim, T.S., Sundaresh, C.S., Feinstein, S.I., Dodia, C., Skach, W.R., Jain, M.K., Nagase, T., Seki, N., Ishikawa, K., Nomura, N. and Fisher, A.B. (1997) Identification of a human cDNA clone for lysosomal type Ca<sup>2+</sup>-independent phospholipase A2 and properties of the expressed protein. *J Biol Chem*, **272**, 2542-2550.
- Kim, Y., Ramirez-Montealegre, D. and Pearce, D.A. (2003) A role in vacuolar arginine transport for yeast Btn1p and for human CLN3, the protein defective in Batten disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 15458-15462.
- Kirkham, M. and Parton, R.G. (2005) Clathrin-independent endocytosis: new insights into caveolae and non-caveolar lipid raft carriers. *Biochim Biophys Acta*, **1746**, 349-363.

- Kollmann, K., Mutenda, K.E., Balleininger, M., Eckermann, E., von Figura, K., Schmidt, B. and Lubke, T. (2005) Identification of novel lysosomal matrix proteins by proteome analysis. *Proteomics*, **5**, 3966-3978.
- Kolter, T. and Sandhoff, K. (2005) Principles of lysosomal membrane digestion: stimulation of sphingolipid degradation by sphingolipid activator proteins and anionic lysosomal lipids. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **21**, 81-103.
- Kornak, U., Kasper, D., Bosl, M.R., Kaiser, E., Schweizer, M., Schulz, A., Friedrich, W., Delling, G. and Jentsch, T.J. (2001) Loss of the ClC-7 chloride channel leads to osteopetrosis in mice and man. *Cell*, **104**, 205-215.
- Kundra, R. and Kornfeld, S. (1999) Asparagine-linked oligosaccharides protect Lamp-1 and Lamp-2 from intracellular proteolysis. *J Biol Chem*, **274**, 31039-31046.
- Kuronita, T., Eskelinen, E.L., Fujita, H., Saftig, P., Himeno, M. and Tanaka, Y. (2002) A role for the lysosomal membrane protein LAMP2 in the biogenesis and maintenance of endosomal and lysosomal morphology. *J Cell Sci*, **115**, 4117-4131.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Lamaze, C., Dujeancourt, A., Baba, T., Lo, C.G., Benmerah, A. and Dautry-Varsat, A. (2001) Interleukin 2 receptors and detergent-resistant membrane domains define a clathrin-independent endocytic pathway. *Mol Cell*, **7**, 661-671.
- Lamaze, C. and Schmid, S.L. (1995) The emergence of clathrin-independent pinocytic pathways. *Curr Opin Cell Biol*, **7**, 573-580.
- Lange, P.F., Wartosch, L., Jentsch, T.J. and Fuhrmann, J.C. (2006) ClC-7 requires Ostm1 as a beta-subunit to support bone resorption and lysosomal function. *Nature*, **440**, 220-223.
- Le Borgne, R., Alconada, A., Bauer, U. and Hoflack, B. (1998) The mammalian AP-3 adaptor-like complex mediates the intracellular transport of lysosomal membrane glycoproteins. *J Biol Chem*, **273**, 29451-29461.
- Lefrancois, S., May, T., Knight, C., Bourbeau, D. and Morales, C.R. (2002) The lysosomal transport of prosaposin requires the conditional interaction of its highly conserved domain with sphingomyelin. *J Biol Chem*, **277**, 17188-17199.
- Lefrancois, S., Zeng, J., Hassan, A.J., Canuel, M. and Morales, C.R. (2003) The lysosomal trafficking of sphingolipid activator proteins (SAPs) is mediated by sortilin. *Embo J*, **22**, 6430-6437.
- Leighton, F., Poole, B., Beaufay, H., Baudhuin, P., Coffey, J.W., Fowler, S. and De Duve, C. (1968) The large-scale separation of peroxisomes, mitochondria, and lysosomes from



- the livers of rats injected with triton WR-1339. Improved isolation procedures, automated analysis, biochemical and morphological properties of fractions. *J Cell Biol*, **37**, 482-513.
- Lemmon, S.K. and Traub, L.M. (2000) Sorting in the endosomal system in yeast and animal cells. *Curr Opin Cell Biol*, **12**, 457-466.
- Liaudet-Coopman, E., Beaujouin, M., Derocq, D., Garcia, M., Glondou-Lassis, M., Laurent-Matha, V., Prebois, C., Rochefort, H. and Vignon, F. (2006) Cathepsin D: newly discovered functions of a long-standing aspartic protease in cancer and apoptosis. *Cancer Lett*, **237**, 167-179.
- Liotta, L.A., Tryggvason, K., Garbisa, S., Hart, I., Foltz, C.M. and Shafie, S. (1980) Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen. *Nature*, **284**, 67-68.
- Liou, H.L., Dixit, S.S., Xu, S., Tint, G.S., Stock, A.M. and Lobel, P. (2006) NPC2, the protein deficient in Niemann-Pick C2 disease, consists of multiple glycoforms that bind a variety of sterols. *J Biol Chem*, **281**, 36710-36723.
- Lombardi, D., Soldati, T., Riederer, M.A., Goda, Y., Zerial, M. and Pfeffer, S.R. (1993) Rab9 functions in transport between late endosomes and the trans Golgi network. *Embo J*, **12**, 677-682.
- Lu, J.Y. and Hofmann, S.L. (2006) Thematic review series: lipid posttranslational modifications. Lysosomal metabolism of lipid-modified proteins. *J Lipid Res*, **47**, 1352-1357.
- Ludwig, T., Munier-Lehmann, H., Bauer, U., Hollinshead, M., Ovitt, C., Lobel, P. and Hoflack, B. (1994) Differential sorting of lysosomal enzymes in mannose 6-phosphate receptor-deficient fibroblasts. *Embo J*, **13**, 3430-3437.
- Luiro, K., Yliannala, K., Ahtiainen, L., Maunu, H., Jarvela, I., Kyttala, A. and Jalanko, A. (2004) Interconnections of CLN3, Hook1 and Rab proteins link Batten disease to defects in the endocytic pathway. *Hum Mol Genet*, **13**, 3017-3027.
- Luzio, J.P., Rous, B.A., Bright, N.A., Pryor, P.R., Mullock, B.M. and Piper, R.C. (2000) Lysosome-endosome fusion and lysosome biogenesis. *J Cell Sci*, **113** (Pt 9), 1515-1524.
- Mahmudi-Azer, S., Downey, G.P. and Moqbel, R. (2002) Translocation of the tetraspanin CD63 in association with human eosinophil mediator release. *Blood*, **99**, 4039-4047.
- Malatack, J.J., Consolini, D.M. and Bayever, E. (2003) The status of hematopoietic stem cell transplantation in lysosomal storage disease. *Pediatr Neurol*, **29**, 391-403.

- Marks, M.S. and Seabra, M.C. (2001) The melanosome: membrane dynamics in black and white. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2**, 738-748.
- Martin, S.J., Reutelingsperger, C.P., McGahon, A.J., Rader, J.A., van Schie, R.C., LaFace, D.M. and Green, D.R. (1995) Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med*, **182**, 1545-1556.
- Maury, E., Prevost, M.C., Nauze, M., Redoules, D., Tarroux, R., Charveron, M., Salles, J.P., Perret, B., Chap, H. and Gassama-Diagne, A. (2002) Human epidermis is a novel site of phospholipase B expression. *Biochem Biophys Res Commun*, **295**, 362-369.
- Mellman, I., Fuchs, R. and Helenius, A. (1986) Acidification of the endocytic and exocytic pathways. *Annu Rev Biochem*, **55**, 663-700.
- Mellors, A. and Tappel, A.L. (1967) Hydrolysis of phospholipids by a lysosomal enzyme. *J Lipid Res*, **8**, 479-485.
- Meresse, S., Gorvel, J.P. and Chavrier, P. (1995) The rab7 GTPase resides on a vesicular compartment connected to lysosomes. *J Cell Sci*, **108 (Pt 11)**, 3349-3358.
- Mijaljica, D., Prescott, M. and Devenish, R.J. (2006) Endoplasmic reticulum and Golgi complex: contributions to, and turnover by, autophagy. *Traffic*, **7**, 1590-1595.
- Mobius, W., van Donselaar, E., Ohno-Iwashita, Y., Shimada, Y., Heijnen, H.F., Slot, J.W. and Geuze, H.J. (2003) Recycling compartments and the internal vesicles of multivesicular bodies harbor most of the cholesterol found in the endocytic pathway. *Traffic*, **4**, 222-231.
- Montcourrier, P., Mangeat, P.H., Salazar, G., Morisset, M., Sahuquet, A. and Rochefort, H. (1990) Cathepsin D in breast cancer cells can digest extracellular matrix in large acidic vesicles. *Cancer Res*, **50**, 6045-6054.
- Morgan, C.P., Insall, R., Haynes, L. and Cockcroft, S. (2004) Identification of phospholipase B from Dictyostelium discoideum reveals a new lipase family present in mammals, flies and nematodes, but not yeast. *Biochem J*, **382**, 441-449.
- Morin, P., Sagne, C. and Gasnier, B. (2004) Functional characterization of wild-type and mutant human sialin. *Embo J*, **23**, 4560-4570.
- Mu, F.T., Callaghan, J.M., Steele-Mortimer, O., Stenmark, H., Parton, R.G., Campbell, P.L., McCluskey, J., Yeo, J.P., Tock, E.P. and Toh, B.H. (1995) EEA1, an early endosome-associated protein. EEA1 is a conserved alpha-helical peripheral membrane protein flanked by cysteine "fingers" and contains a calmodulin-binding IQ motif. *J Biol Chem*, **270**, 13503-13511.

- Mullock, B.M., Bright, N.A., Fearon, C.W., Gray, S.R. and Luzio, J.P. (1998) Fusion of lysosomes with late endosomes produces a hybrid organelle of intermediate density and is NSF dependent. *J Cell Biol*, **140**, 591-601.
- Murphy, R.F. (1991) Maturation models for endosome and lysosome biogenesis. *Trends Cell Biol*, **1**, 77-82.
- Neufeld, E.F., Sando, G.N., Garvin, A.J. and Rome, L.H. (1977) The transport of lysosomal enzymes. *J Supramol Struct*, **6**, 95-101.
- Norbury, C.C. (2006) Drinking a lot is good for dendritic cells. *Immunology*, **117**, 443-451.
- Otway, S. and Robinson, D.S. (1967) The use of a non-ionic detergent (Triton WR 1339) to determine rates of triglyceride entry into the circulation of the rat under different physiological conditions. *J Physiol*, **190**, 321-332.
- Owada, M. and Neufeld, E.F. (1982) Is there a mechanism for introducing acid hydrolases into liver lysosomes that is independent of mannose 6-phosphate recognition? Evidence from I-cell disease. *Biochem Biophys Res Commun*, **105**, 814-820.
- Patki, V., Virbasius, J., Lane, W.S., Toh, B.H., Shpetner, H.S. and Corvera, S. (1997) Identification of an early endosomal protein regulated by phosphatidylinositol 3-kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 7326-7330.
- Perez, S.E. and Steller, H. (1996) Molecular and genetic analyses of lama, an evolutionarily conserved gene expressed in the precursors of the Drosophila first optic ganglion. *Mech Dev*, **59**, 11-27.
- Pham, C.T., Armstrong, R.J., Zimonjic, D.B., Popescu, N.C., Payan, D.G. and Ley, T.J. (1997) Molecular cloning, chromosomal localization, and expression of murine dipeptidyl peptidase I. *J Biol Chem*, **272**, 10695-10703.
- Piret, J., Schanck, A., Delfosse, S., Van Bambeke, F., Kishore, B.K., Tulkens, P.M. and Mingeot-Leclercq, M.P. (2005) Modulation of the in vitro activity of lysosomal phospholipase A1 by membrane lipids. *Chem Phys Lipids*, **133**, 1-15.
- Pisoni, R.L. and Thoene, J.G. (1991) The transport systems of mammalian lysosomes. *Biochim Biophys Acta*, **1071**, 351-373.
- Plo, I., Lautier, D., Levade, T., Sekouri, H., Jaffrezou, J.P., Laurent, G. and Bettaieb, A. (2000) Phosphatidylcholine-specific phospholipase C and phospholipase D are respectively implicated in mitogen-activated protein kinase and nuclear factor kappaB activation in tumour-necrosis-factor-alpha-treated immature acute-myeloid-leukaemia cells. *Biochem J*, **351 Pt 2**, 459-467.

- Poet, M., Kornak, U., Schweizer, M., Zdebik, A.A., Scheel, O., Hoelter, S., Wurst, W., Schmitt, A., Fuhrmann, J.C., Planells-Cases, R., Mole, S.E., Hubner, C.A. and Jentsch, T.J. (2006) Lysosomal storage disease upon disruption of the neuronal chloride transport protein ClC-6. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 13854-13859.
- Pollard, T.D. and Earnshaw, W.C. (2004) *Cell Biology*. Elsevier.
- Press, B., Feng, Y., Hoflack, B. and Wandinger-Ness, A. (1998) Mutant Rab7 causes the accumulation of cathepsin D and cation-independent mannose 6-phosphate receptor in an early endocytic compartment. *J Cell Biol*, **140**, 1075-1089.
- Raiborg, C., Rusten, T.E. and Stenmark, H. (2003) Protein sorting into multivesicular endosomes. *Curr Opin Cell Biol*, **15**, 446-455.
- Ramirez, A., Heimbach, A., Grundemann, J., Stiller, B., Hampshire, D., Cid, L.P., Goebel, I., Mubaidin, A.F., Wriekat, A.L., Roeper, J., Al-Din, A., Hillmer, A.M., Karsak, M., Liss, B., Woods, C.G., Behrens, M.I. and Kubisch, C. (2006) Hereditary parkinsonism with dementia is caused by mutations in ATP13A2, encoding a lysosomal type 5 P-type ATPase. *Nat Genet*, **38**, 1184-1191.
- Richieri, G.V. and Kleinfeld, A.M. (1995) Continuous measurement of phospholipase A2 activity using the fluorescent probe ADIFAB. *Anal Biochem*, **229**, 256-263.
- Rigtrup, K.M., Kakkad, B. and Ong, D.E. (1994) Purification and partial characterization of a retinyl ester hydrolase from the brush border of rat small intestine mucosa: probable identity with brush border phospholipase B. *Biochemistry*, **33**, 2661-2666.
- Rijnboutt, S., Kal, A.J., Geuze, H.J., Aerts, H. and Strous, G.J. (1991a) Mannose 6-phosphate-independent targeting of cathepsin D to lysosomes in HepG2 cells. *J Biol Chem*, **266**, 23586-23592.
- Rijnboutt, S., Aerts, H.M., Geuze, H.J., Tager, J.M. and Strous, G.J. (1991b) Mannose 6-phosphate-independent membrane association of cathepsin D, glucocerebrosidase, and sphingolipid-activating protein in HepG2 cells. *J Biol Chem*, **266**, 4862-4868.
- Rink, J., Ghigo, E., Kalaidzidis, Y. and Zerial, M. (2005) Rab conversion as a mechanism of progression from early to late endosomes. *Cell*, **122**, 735-749.
- Robinson, M. and Waite, M. (1983) Physical-chemical requirements for the catalysis of substrates by lysosomal phospholipase A1. *J Biol Chem*, **258**, 14371-14378.
- Roth, W., Deussing, J., Botchkarev, V.A., Pauly-Evers, M., Saftig, P., Hafner, A., Schmidt, P., Schmahl, W., Scherer, J., Anton-Lamprecht, I., Von Figura, K., Paus, R. and Peters, C. (2000) Cathepsin L deficiency as molecular defect of furless:

- hyperproliferation of keratinocytes and perturbation of hair follicle cycling. *Faseb J*, **14**, 2075-2086.
- Rous, B.A., Reaves, B.J., Ihrke, G., Briggs, J.A., Gray, S.R., Stephens, D.J., Banting, G. and Luzio, J.P. (2002) Role of adaptor complex AP-3 in targeting wild-type and mutated CD63 to lysosomes. *Mol Biol Cell*, **13**, 1071-1082.
- Saftig, P. (2005) *Lysosomes*. Landes Bioscience, Texas.
- Saftig, P., Hunziker, E., Wehmeyer, O., Jones, S., Boyde, A., Rommerskirch, W., Moritz, J.D., Schu, P. and von Figura, K. (1998) Impaired osteoclastic bone resorption leads to osteopetrosis in cathepsin-K-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 13453-13458.
- Sagne, C., Agulhon, C., Ravassard, P., Darmon, M., Hamon, M., El Mestikawy, S., Gasnier, B. and Giros, B. (2001) Identification and characterization of a lysosomal transporter for small neutral amino acids. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 7206-7211.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Schlame, M., Shanske, S., Doty, S., Konig, T., Sculco, T., DiMauro, S. and Blanck, T.J. (1999) Microanalysis of cardiolipin in small biopsies including skeletal muscle from patients with mitochondrial disease. *J Lipid Res*, **40**, 1585-1592.
- Schrag, J.D. and Cygler, M. (1997) Lipases and alpha/beta hydrolase fold. *Methods Enzymol*, **284**, 85-107.
- Shaul, P.W. and Anderson, R.G. (1998) Role of plasmalemmal caveolae in signal transduction. *Am J Physiol*, **275**, L843-851.
- Shipley, J.M., Grubb, J.H. and Sly, W.S. (1993) The role of glycosylation and phosphorylation in the expression of active human beta-glucuronidase. *J Biol Chem*, **268**, 12193-12198.
- Simons, K. and Toomre, D. (2000) Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **1**, 31-39.
- Simonsen, A., Lippe, R., Christoforidis, S., Gaullier, J.M., Brech, A., Callaghan, J., Toh, B.H., Murphy, C., Zerial, M. and Stenmark, H. (1998) EEA1 links PI(3)K function to Rab5 regulation of endosome fusion. *Nature*, **394**, 494-498.
- Sleat, D.E., Sohar, I., Lackland, H., Majercak, J. and Lobel, P. (1996) Rat brain contains high levels of mannose-6-phosphorylated glycoproteins including lysosomal enzymes and palmitoyl-protein thioesterase, an enzyme implicated in infantile neuronal lipofuscinosis. *J Biol Chem*, **271**, 19191-19198.

- Sleat, D.E., Lackland, H., Wang, Y., Sohar, I., Xiao, G., Li, H. and Lobel, P. (2005) The human brain mannose 6-phosphate glycoproteome: a complex mixture composed of multiple isoforms of many soluble lysosomal proteins. *Proteomics*, **5**, 1520-1532.
- Sleat, D.E., Wang, Y., Sohar, I., Lackland, H., Li, Y., Li, H., Zheng, H. and Lobel, P. (2006a) Identification and validation of mannose 6-phosphate glycoproteins in human plasma reveals a wide range of lysosomal and non-lysosomal proteins. *Mol Cell Proteomics*.
- Sleat, D.E., Zheng, H., Qian, M. and Lobel, P. (2006b) Identification of sites of mannose 6-phosphorylation on lysosomal proteins. *Mol Cell Proteomics*, **5**, 686-701.
- Sonderfeld-Fresko, S. and Proia, R.L. (1989) Analysis of the glycosylation and phosphorylation of the lysosomal enzyme, beta-hexosaminidase B, by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem*, **264**, 7692-7697.
- Sonnichsen, B., De Renzis, S., Nielsen, E., Rietdorf, J. and Zerial, M. (2000) Distinct membrane domains on endosomes in the recycling pathway visualized by multicolor imaging of Rab4, Rab5, and Rab11. *J Cell Biol*, **149**, 901-914.
- Steet, R., Lee, W.S. and Kornfeld, S. (2005) Identification of the minimal lysosomal enzyme recognition domain in cathepsin D. *J Biol Chem*, **280**, 33318-33323.
- Stein, M., Zijderhand-Bleekemolen, J.E., Geuze, H., Hasilik, A. and von Figura, K. (1987) Mr 46,000 mannose 6-phosphate specific receptor: its role in targeting of lysosomal enzymes. *Embo J*, **6**, 2677-2681.
- Storrie, B. and Desjardins, M. (1996) The biogenesis of lysosomes: is it a kiss and run, continuous fusion and fission process? *Bioessays*, **18**, 895-903.
- Tabuchi, M., Yoshimori, T., Yamaguchi, K., Yoshida, T. and Kishi, F. (2000) Human NRAMP2/DMT1, which mediates iron transport across endosomal membranes, is localized to late endosomes and lysosomes in HEp-2 cells. *J Biol Chem*, **275**, 22220-22228.
- Takemori, H., Zolotaryov, F.N., Ting, L., Urbain, T., Komatsubara, T., Hatano, O., Okamoto, M. and Tojo, H. (1998) Identification of functional domains of rat intestinal phospholipase B/lipase. Its cDNA cloning, expression, and tissue distribution. *J Biol Chem*, **273**, 2222-2231.
- Tanaka, Y., Guhde, G., Suter, A., Eskelinen, E.L., Hartmann, D., Lullmann-Rauch, R., Janssen, P.M., Blanz, J., von Figura, K. and Saftig, P. (2000) Accumulation of autophagic vacuoles and cardiomyopathy in LAMP-2-deficient mice. *Nature*, **406**, 902-906.

- Taniyama, Y., Shibata, S., Kita, S., Horikoshi, K., Fuse, H., Shirafuji, H., Sumino, Y. and Fujino, M. (1999) Cloning and expression of a novel lysophospholipase which structurally resembles lecithin cholesterol acyltransferase. *Biochem Biophys Res Commun*, **257**, 50-56.
- Tardy, C., Tyynela, J., Hasilik, A., Levade, T. and Andrieu-Abadie, N. (2003) Stress-induced apoptosis is impaired in cells with a lysosomal targeting defect but is not affected in cells synthesizing a catalytically inactive cathepsin D. *Cell Death Differ*, **10**, 1090-1100.
- Tepel, C., Bromme, D., Herzog, V. and Brix, K. (2000) Cathepsin K in thyroid epithelial cells: sequence, localization and possible function in extracellular proteolysis of thyroglobulin. *J Cell Sci*, **113 Pt 24**, 4487-4498.
- Tiede, S., Storch, S., Lubke, T., Henrissat, B., Bargal, R., Raas-Rothschild, A. and Braulke, T. (2005) Mucopolidosis II is caused by mutations in GNPTA encoding the alpha/beta GlcNAc-1-phosphotransferase. *Nat Med*, **11**, 1109-1112.
- Touret, N., Paroutis, P., Terebiznik, M., Harrison, R.E., Trombetta, S., Pypaert, M., Chow, A., Jiang, A., Shaw, J., Yip, C., Moore, H.P., van der Wel, N., Houben, D., Peters, P.J., de Chastellier, C., Mellman, I. and Grinstein, S. (2005) Quantitative and dynamic assessment of the contribution of the ER to phagosome formation. *Cell*, **123**, 157-170.
- Tribl, F., Gerlach, M., Marcus, K., Asan, E., Tatschner, T., Arzberger, T., Meyer, H.E., Bringmann, G. and Riederer, P. (2005) "Subcellular proteomics" of neuromelanin granules isolated from the human brain. *Mol Cell Proteomics*, **4**, 945-957.
- Turk, B., Turk, D. and Turk, V. (2000) Lysosomal cysteine proteases: more than scavengers. *Biochim Biophys Acta*, **1477**, 98-111.
- Valenzano, K.J., Kallay, L.M. and Lobel, P. (1993) An assay to detect glycoproteins that contain mannose 6-phosphate. *Anal Biochem*, **209**, 156-162.
- Velasco, G., Ferrando, A.A., Puente, X.S., Sanchez, L.M. and Lopez-Otin, C. (1994) Human cathepsin O. Molecular cloning from a breast carcinoma, production of the active enzyme in *Escherichia coli*, and expression analysis in human tissues. *J Biol Chem*, **269**, 27136-27142.
- Verger, R. (1980) Enzyme kinetics of lipolysis. *Methods Enzymol*, **64**, 340-392.
- von Figura, K. and Hasilik, A. (1986) Lysosomal enzymes and their receptors. *Annu Rev Biochem*, **55**, 167-193.

- Waguri, S., Dewitte, F., Le Borgne, R., Rouille, Y., Uchiyama, Y., Dubremetz, J.F. and Hoflack, B. (2003) Visualization of TGN to endosome trafficking through fluorescently labeled MPR and AP-1 in living cells. *Mol Biol Cell*, **14**, 142-155.
- Wang, A. and Dennis, E.A. (1999) Mammalian lysophospholipases. *Biochim Biophys Acta*, **1439**, 1-16.
- Wattiaux, R. and Wattiaux-de Coninck, S. (1967) Influence of the injection of "Triton WR-1339" on lysosomes of a rat transplantable hepatoma. *Nature*, **216**, 1132-1133.
- Watts, C. (2001) Antigen processing in the endocytic compartment. *Curr Opin Immunol*, **13**, 26-31.
- Wilkening, G., Linke, T. and Sandhoff, K. (1998) Lysosomal degradation on vesicular membrane surfaces. Enhanced glucosylceramide degradation by lysosomal anionic lipids and activators. *J Biol Chem*, **273**, 30271-30278.
- Winchester, B. (2005) Lysosomal metabolism of glycoproteins. *Glycobiology*, **15**, 1R-15R.
- Yamashiro, D.J., Tycko, B., Fluss, S.R. and Maxfield, F.R. (1984) Segregation of transferrin to a mildly acidic (pH 6.5) para-Golgi compartment in the recycling pathway. *Cell*, **37**, 789-800.
- Yan, S., Sameni, M. and Sloane, B.F. (1998) Cathepsin B and human tumor progression. *Biol Chem*, **379**, 113-123.
- Yasuda, T., Takeshita, H., Iida, R., Tsutsumi, S., Nakajima, T., Hosomi, O., Nakashima, Y., Mori, S. and Kishi, K. (1998) Structure and organization of the human deoxyribonuclease II (DNase II) gene. *Ann Hum Genet*, **62**, 299-305.
- Yorimitsu, T. and Klionsky, D.J. (2005) Autophagy: molecular machinery for self-eating. *Cell Death Differ*, **12 Suppl 2**, 1542-1552.
- Zachowski, A. (1993) Phospholipids in animal eukaryotic membranes: transverse asymmetry and movement. *Biochem J*, **294 (Pt 1)**, 1-14.
- Zhao, R., Fu, X., Li, Q., Krantz, S.B. and Zhao, Z.J. (2003) Specific interaction of protein tyrosine phosphatase-MEG2 with phosphatidylserine. *J Biol Chem*, **278**, 22609-22614.





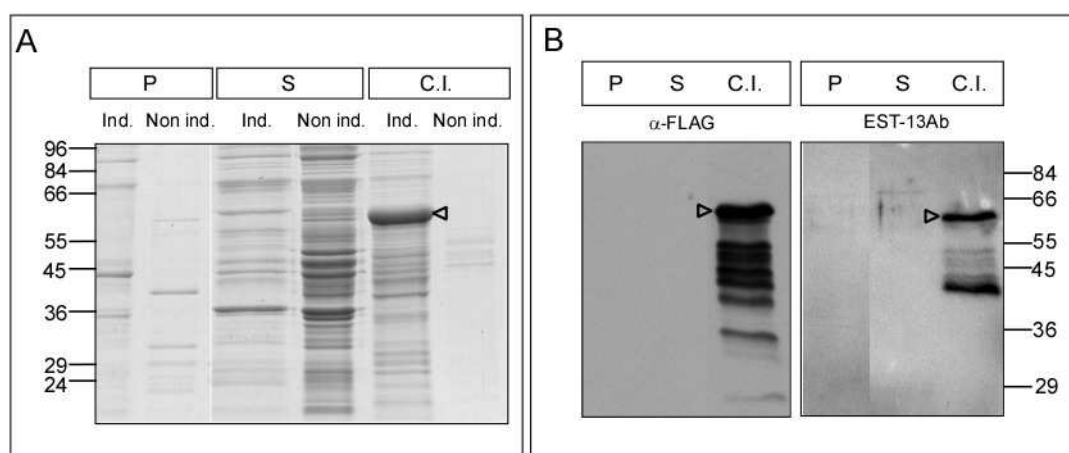
## **ANNEXE**

ANNEXE 1 : La protéine recombinante FLAG-hp76 produite en bactérie



## I. ANNEXE 1 : La protéine recombinante FLAG-hp76 produite en bactérie

Dans le but de produire un anticorps polyclonal dirigé contre la protéine hp76 entière, la protéine chimère recombinante FLAG-hp76 a d'abord été produite dans des bactéries BL21. Après un fractionnement qui sépare le périplasme, la fraction soluble du cytosol et les corps d'inclusion (cf Matériel et Méthodes), puis une analyse de ces fractions par SDS-PAGE, une bande importante apparaît dans la piste des corps d'inclusions des bactéries dont l'expression de FLAG-hp76 a été induite (Figure 59A, tête de flèche).



**Figure 59. Fractionnement de *E. coli*/FLAG-hp76.**

(A) Analyse en gel SDS-PAGE (10% de polyacrylamide), coloré au bleu de Coomassie de fractions périplasmiques (P), fractions solubles (S) et corps d'inclusion (C.I.) de *E. coli*. L'expression de la protéine FLAG-hp76 recombinante a été induite (Ind.) ou non (Non Ind.) à l'IPTG.

(B) Les fractions P, S et C.I. induites ont été analysées par Western blot et révélées avec EST-13Ab et l'anticorps anti-FLAG ( $\alpha$ -FLAG). La tête de flèche désigne la protéine FLAG-hp76 recombinante, présente dans les corps d'inclusions.

Bien que le plasmide employé contienne la séquence signal de la protéine bactérienne OmpA permettant théoriquement la sécrétion de FLAG-hp76 dans le périplasme, FLAG-hp76 n'est visualisée que dans les corps d'inclusion. Cette observation a été confirmée par une analyse par Western blot de ces fractions : les anticorps anti-FLAG et EST13Ab ne reconnaissent des espèces protéiques que dans la fraction « corps d'inclusion ». Ils détectent tous les deux une protéine à 60 kDa. L'anticorps anti-FLAG détecte en plus une série de sept bandes de taille comprise entre 50 et 34 kDa. L'anticorps EST-13Ab, le seul anticorps anti-p76 disponible au moment de cette étude, reconnaît également une bande à 38 kDa (Figure 59B), et faiblement la série de bandes qui migre entre les deux.

Une grande quantité de corps d'inclusion a été produite, purifiée et injectée comme antigène dans des lapins. L'anticorps obtenu a été appelé « hp76Ab ». Par Western blot, il reconnaît avec une forte intensité toutes les bandes des corps d'inclusion de 60 à 34 kDa, et même des fragments plus petits, vers 25 kDa. En revanche, dans un échantillon de protéines M6P purifiées de U937, il détecte une bande unique à 76 kDa, attestant de sa capacité à reconnaître hp76 sous sa forme endogène (Figure 59B).

Le résultat du Western blot révélé par l'anticorps anti-FLAG indique que les fragments de FLAG-hp76 ont bien leur extrémité N-terminale FLAG (Figure 59B). Comme ils sont de plus en plus courts, l'hypothèse est qu'il leur manque des peptides de plus en plus longs du côté C-terminal. Dans le but de vérifier ce point, les 6 bandes protéiques majeures à 60, 49, un doublet à 45, 41 et 38 kDa ont été découpées du gel SDS-PAGE et analysées en MALDI-TOF. Le Tableau 12 montre les peptides identifiés dans la séquence de FLAG-hp76 (en grisé).

**Tableau 12. Analyse en MALDI-TOF des bandes de gel de corps d'inclusion de FLAG-hp76.**

masse moléculaire de la bande du gel SDS-PAGE (kDa)	Séquence FLAG-hp76
60	<p>MKKTAIAIAVALAGFATVAQADYKDDDDKVKLIPAGGRWARDGQVPPASRSRSVLLDVSAGQLLMVD  GRHPDAVAVANLTNAIRETGWAFLGLTSGQYNDLSQAYAAAGVVEAAVSEELIYMHWMNTVVNYCGP  FEYEVGYCERLKSFLANLEWMQEEMESNPDSYWHQVRLTLLQLKGLSDSYEGRVSPAGKFTIKPLGF  LLLQLSGDLELALNKTNIKPSLGSFGSALIKLLPGQSDLLVAHNTWNNYQHMLRVIKKYWLQFREG  PWGDYPLVPGNKLVFSSYPGTIFSCDDFYILGSLVTLETTIGNKNPALWKYVRPRGCVLEWVRNIVANR</p> <p><b>LASDGATWADIFKR<sub>368</sub></b>FNSGTYNQWMIVDYKAFIPGGPSPGSR<sub>396</sub>VTILEQIPGMVVVADKTSELYQK  TYWASYNIPSFETVFNASGLQALVAQYGDWFSYDGSPRAQIFRR<sub>455</sub>NQSLVQDMDSMVRLMR<sub>470</sub>YNDFL  HDPLSLCKACNPQNGENASARSDLNPANGSYPFKALRQRSHGGIDVKVTSMLARILSLLAASGPTWDQ  VPPFQWSTSPFSGLLHMGQPDWKFAPVKVSWD<sub>589</sub></p>
49	<p>MKKTAIAIAVALAGFATVAQADYKDDDDKVKLIPAGGRWARDGQVPPASRSRSVLLDVSAGQLLMVD  GRHPDAVAVANLTNAIRETGWAFLGLTSGQYNDLSQAYAAAGVVEAAVSEELIYMHWMNTVVNYCGP  FEYEVGYCERLKSFLANLEWMQEEMESNPDSYWHQVRLTLLQLKGLSDSYEGRVSPAGKFTIKPLGF  LLLQLSGDLELALNKTNIKPSLGSFGSALIKLLPGQSDLLVAHNTWNNYQHMLRVIKKYWLQFREG  PWGDYPLVPGNKLVFSSYPGTIFSCDDFYILGSLVTLETTIGNKNPALWKYVRPRGCVLEWVRNIVANR</p> <p><b>LASDGATWADIFKR<sub>368</sub></b>FNSGTYNQWMIVDYKAFIPGGPSPGSR<sub>396</sub>VTILEQIPGMVVVADKTSELYQK  TYWASYNIPSFETVFNASGLQALVAQYGDWFSYDGSPRAQIFRR<sub>455</sub>NQSLVQDMDSMVRLMR<sub>470</sub>//</p>
45 (fin doublet) Résultat identique pour les deux bandes	<p>MKKTAIAIAVALAGFATVAQADYKDDDDKVKLIPAGGRWARDGQVPPASRSRSVLLDVSAGQLLMVD  GRHPDAVAVANLTNAIRETGWAFLGLTSGQYNDLSQAYAAAGVVEAAVSEELIYMHWMNTVVNYCGP  FEYEVGYCERLKSFLANLEWMQEEMESNPDSYWHQVRLTLLQLKGLSDSYEGRVSPAGKFTIKPLGF  LLLQLSGDLELALNKTNIKPSLGSFGSALIKLLPGQSDLLVAHNTWNNYQHMLRVIKKYWLQFREG  PWGDYPLVPGNKLVFSSYPGTIFSCDDFYILGSLVTLETTIGNKNPALWKYVRPRGCVLEWVRNIVANR</p> <p><b>LASDGATWADIFKR<sub>368</sub></b>FNSGTYNQWMIVDYKAFIPGGPSPGSR<sub>396</sub>VTILEQIPGMVVVADKTSELYQK  TYWASYNIPSFETVFNASGLQALVAQYGDWFSYDGSPRAQIFRR<sub>455</sub>//</p>
41	<p>MKKTAIAIAVALAGFATVAQADYKDDDDKVKLIPAGGRWARDGQVPPASRSRSVLLDVSAGQLLMVD  GRHPDAVAVANLTNAIRETGWAFLGLTSGQYNDLSQAYAAAGVVEAAVSEELIYMHWMNTVVNYCGP  FEYEVGYCERLKSFLANLEWMQEEMESNPDSYWHQVRLTLLQLKGLSDSYEGRVSPAGKFTIKPLGF  LLLQLSGDLELALNKTNIKPSLGSFGSALIKLLPGQSDLLVAHNTWNNYQHMLRVIKKYWLQFREG  PWGDYPLVPGNKLVFSSYPGTIFSCDDFYILGSLVTLETTIGNKNPALWKYVRPRGCVLEWVRNIVANR</p> <p><b>LASDGATWADIFKR<sub>368</sub></b>FNSGTYNQWMIVDYKAFIPGGPSPGSR<sub>396</sub>//</p>

MKKTAIAIAVALAGFATVAQADYKDDDDKVKLIPAPGGRWARDGQVPPASRSVLLDVSAGQLLMVD  
 GRHPDAVAWANLTNAIRETGWAFLELGTSGQYNDSLQAYAAAGVVEAAVSEELIYMHWMNTVVNYCGP  
 FEYEVGYCERLKSFLEANLEWMQEEMESNPDSPLYWHQVRLTLLQLKGLSDSYEGRVSFPAGKFTIKPLGF  
 LLLQLSGDLELELALNKTNIKPSLGSGLSALIKLLPGQSDLLVAHNTWNNYQHMLRVIKKYWLQFREG  
 PWGDYPLVPGNKLVESSYPGTIFSCDDFYILGSLVTLETTIGNKNPALWKYVRPRGCVLEWVRNIVANR  
 LASDGATWADIFKR<sub>368</sub>//

**Peptides grisés** : peptides identifiés en MALDI-TOF

// : site de coupure « prédit » (au plus long) d'après l'analyse en MALDI-TOF

**XX** : épitope contre lequel est dirigé l'anticorps EST-13Ab

On remarque que la masse moléculaire décroissante des fragments est effectivement corrélée à la disparition des peptides de l'extrémité C-terminale de FLAG-hp76. Le site de coupure peut être déterminé ou plus moins précisément sur la séquence, selon que les peptides qui disparaissent d'une bande à l'autre sont contigus ou pas.

Cette production de FLAG-hp76 sous des formes tronquées à partir de leur extrémité C-terminale est probablement la conséquence d'un arrêt de la traduction dû à l'épuisement des ARN de transfert, du fait de la forte surexpression.

.



## **PUBLICATION**





# Biochemical characterization and lysosomal localization of the mannose-6-phosphate protein p76 (hypothetical protein LOC196463)

Anaïs G. JENSEN\*, Magali CHEMALI\*, Agnès CHAPEL\*, Sylvie KIEFFER-JAQUINOD\*, Michel JADOT†, Jérôme GARIN\* and Agnès JOURNET\*<sup>1</sup>

\*Commissariat à l'Energie Atomique, Direction des Sciences du Vivant, Département Dynamique et Réponse Cellulaire, Laboratoire de Chimie des Protéines, Grenoble F-38054, France; INSERM, ERM 0201, Grenoble F-38054, France; Université Joseph Fourier, Grenoble F-38054, France, and †Unité de Recherche en Physiologie Moléculaire, Laboratoire de Chimie Physiologique, Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix, B-5000 Namur, Belgium

Most soluble lysosomal proteins carry Man6P (mannose 6-phosphate), a specific carbohydrate marker that enables their binding to cellular MPRs (Man6P receptors) and their subsequent targeting towards the lysosome. This characteristic was exploited to identify novel soluble lysosomal proteins by proteomic analysis of Man6P proteins purified from a human cell line. Among the proteins identified during the course of the latter study [Journet, Chapel, Kieffer, Roux and Garin (2002) *Proteomics*, **2**, 1026–1040], some had not been previously described as lysosomal proteins. We focused on a protein detected at 76 kDa by SDS/PAGE. We named this protein 'p76' and it appeared later in the NCBI protein database as the 'hypothetical protein LOC196463'. In the present paper, we describe the identification of p76 by MS and we analyse several of its biochemical characteristics. The

presence of Man6P sugars was confirmed by an MPR overlay experiment, which showed the direct and Man6P-dependent interaction between p76 and the MPR. The presence of six *N*-glycosylation sites was validated by progressive peptide-*N*-glycosidase F deglycosylation. Experiments using N- and C-termini directed anti-p76 antibodies provided insights into p76 maturation. Most importantly, we were able to demonstrate the lysosomal localization of this protein, which was initially suggested by its Man6P tags, by both immunofluorescence and sub-cellular fractionation of mouse liver homogenates.

**Key words:** lysosomal localization, mannose 6-phosphate, post-translational modification, proteomics, sub-cellular fractionation.

## INTRODUCTION

Lysosomes are membrane delimited intracellular organelles with an intraluminal acidic pH, which, for a long time, were considered simply as the main digestive compartment of the cell. The degradation of macromolecules inside lysosomes is performed through the action of more than 50 hydrolases and associated accessory proteins. About 40 human disorders are related to mutations in genes encoding lysosomal proteins, and named lysosomal storage diseases, according to their cellular effects [1]. Although the precise mechanisms have not yet been elucidated completely, lysosomes have been shown to be involved in many other cellular processes, such as antigen processing and presentation [2]. Moreover, lysosomes could be involved in programmed cell death [3].

During their biosynthesis, soluble lysosomal proteins acquire, on *N*-linked oligosaccharides, a Man6P (mannose 6-phosphate) marker, which is recognised by two MPRs (Man6P receptors), the small cation-dependent MPR and the large cation-independent MPR [4]. The MPRs sort soluble lysosomal proteins towards the endosomes, where they release their cargo due to the low pH of the organelles. Finally, the soluble lysosomal proteins reach lysosomes where their Man6P tag is dephosphorylated [5].

Over the last decade, proteomic analyses aimed at identifying soluble lysosomal proteins have been performed on Man6P proteins that have been purified by affinity for immobilized MPRs. Several of these studies [6–9] were carried out on proteins purified from cell secretions. Body fluids such as urine [10] or

plasma [11] were also used as a source of extracellular Man6P proteins. Studies dealing with intracellular Man6P proteins were performed on a few transformed cell lines [12], but mainly on brain homogenates [13–15]. Indeed, as lysosomal Man6P protein dephosphorylation is less efficient in the brain compared with other organs [13,16], the brain is the most appropriate organ for purification of mature lysosomal proteins through their Man6P sugar.

Our own proteomic studies of Man6P proteins purified from human cell secretions [6,7] led us to the discovery of a novel protein that we named 'p76' because of its apparent molecular mass. In the present paper, we describe its identification as the hypothetical protein LOC196463, its biochemical characterization and, finally, we demonstrate effectively its lysosomal localization.

## EXPERIMENTAL

### MS analysis and N-terminal protein sequence determination

Proteins were identified by MALDI-TOF-MS (matrix-assisted laser-desorption ionization-time-of-flight MS) peptide fingerprinting or LC-MS/MS analysis as described previously [7,17]. For N-terminal sequence analysis, Edman degradation of electroblotted proteins [6] was performed by the Laboratoire d'Enzymologie Moléculaire (Institut de Biologie Structurale, Grenoble, France) using an Applied Biosystems gas-phase sequencer (model 492) and an Applied Biosystems Model 140C

Abbreviations used: 293-EBNA, human embryonic kidney 293 cells stably transformed with Epstein-Barr virus nuclear antigen; 2DE, 2-dimensional electrophoresis; CEA, Commissariat à l'Energie Atomique; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; FBS, fetal bovine serum; hp76, human p76; HRP, horseradish peroxidase; LAMP1, lysosomal-associated membrane protein 1; LC-MS/MS, LC-tandem MS; MALDI-TOF-MS, matrix-assisted laser-desorption ionization-time-of-flight MS; Man6P, mannose 6-phosphate; mp76, mouse p76; MPR, Man6P receptor; PNGase F, peptide-*N*-glycosidase F; sCI-MPR, soluble cation-independent mannose-6-phosphate receptor; TBST, Tris buffered saline containing 0.1% Tween-20; UTR, untranslated region.

<sup>1</sup> To whom correspondence should be addressed (email agnes.journet@cea.fr).

HPLC system with the model 610A data analysis software package (version 2.1).

### Bioinformatics

Tools found on the ExPasy server ([www.expasy.org](http://www.expasy.org)) were used for primary sequence analyses (Blast, Compute pI/Mw, SignalP 3.0 and NetNGlyc 1.0). Genomic, transcriptomic and protein data were obtained from the Ensembl ([www.ensembl.org/index.html](http://www.ensembl.org/index.html)), SymAtlas ([www.symatlas.gnf.org](http://www.symatlas.gnf.org)) and NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) web sites.

### Molecular cloning and Northern blot analysis

All inserts were generated by PCR using the Expand High Fidelity System (Roche). Sequences of the constructs were verified by DNA sequencing. hp76 (human p76) cDNA was initially obtained by reverse transcriptase-PCR on U937 mRNA with the F1/R1 primers (see Supplementary Table 1 at <http://www.BiochemJ.org/bj/402/bj4020449add.htm>). The vector pFLAG-hp76 was generated by cloning the sequence encoding hp76, from which both the signal sequence and the stop codon had been removed (F2/R2 primers; Supplementary Table 1), into the pFLAG-ATS bacterial expression vector (Sigma–Aldrich). For eukaryotic expression, hp76 cDNA was cloned into the pcDNA3.1-Myc-His(+)-A vector (Invitrogen), generating pcDNA3.1-hp76-Myc-His. The DNA sequence encoding the hp76-Myc-His<sub>6</sub> fusion protein (hp76-Myc) was then PCR-amplified from pcDNA3.1-hp76-Myc-His (F3/R3 primer pair; Supplementary Table 1) and inserted into the pCEP4 expression vector (Invitrogen), generating pCEP4-hp76-Myc-His. An expression vector encoding hp76 without a tag was generated, by ligation of the 5' KpnI–BamHI hp76 fragment, purified from pCEP4-hp76-Myc-His, and of the 3' BamHI–XhoI hp76 fragment, obtained by digestion of a longer PCR-amplified hp76 fragment (F4/R4 primer pair; Supplementary Table 1), into the pcDNA3.1 vector (Invitrogen).

The plasmid pCMV-SPORT6-mp76 (mouse p76; clone IRAVp968E0290D6), encoding mp76, was obtained from RZPD (Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung).

Northern blot analysis was performed on a human Multiple Tissue Northern blot (Clontech) by hybridization with a specific hp76 cDNA fragment and with the control human  $\beta$ -actin cDNA, as described previously [18].

### Cell lines and transfections

HeLa, U937 and Rat2 cells were from the American Type Culture Collection (ATCC), and 293-EBNA (human embryonic kidney 293 cells stably transformed with Epstein–Barr virus nuclear antigen) cells were from Invitrogen. Murine JR11 fibroblasts [19] were a kind gift from Dr B. Hoflack (Biotechnological Center, Technical University of Dresden, Germany). These cells constitutively secrete Man6P proteins because they have a deficiency in both MPRs.

HeLa, 293-EBNA, Rat2 and JR11 cells were grown in DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium)–GlutamaxI supplemented with 10% (v/v) FBS (fetal bovine serum), while U937 cells were maintained in RPMI–GlutamaxI medium supplemented with 10% (v/v) FBS. Media and serum were from Invitrogen.

HeLa cells were transiently transfected using the Fugene<sup>®</sup> 6 reagent (Roche) and processed 3 or 4 days later for analysis. 293-EBNA cells were transfected with pCEP4 or pCEP4-hp76-Myc-His by calcium phosphate precipitation [20], and stable transfectants (293/mock or 293/hp76-Myc) were selected using 0.3 mg/ml hygromycin B (Invitrogen).

### Expression and purification of recombinant proteins

The FLAG–p76 recombinant protein was expressed and purified in inclusion bodies from transformed *Escherichia coli* BL21 cells as described previously [21]. For analysis of hp76-Myc, supernatants from confluent 293/mock or 293/hp76-Myc cells, cultivated in DMEM–GlutaMax I without FBS nor hygromycin B, were collected three times a week for a duration of 1 month and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### Production of anti-p76 antibodies

Purified FLAG–hp76 inclusion bodies were injected into rabbits to raise hp76Ab polyclonal antibodies (Charles River Laboratories, Chatillon-sur-Chalaronne, France), as described previously [21].

Two rat peptides TRNPRAKIFQRDQS and SQPDLWMFSPV-KVPWD (residues 76–89 and 196–211 respectively according to the incomplete NCBI entry AAM23313), and the human N-terminal peptide IPAPGGRWARDGQVPPASR (residues 42–60, according to LOC196463) were synthesized with an additional cysteine residue (NeoMPS, Strasbourg, France) and coupled to activated maleimide ovalbumin (Pierce). The lyophilized antigens were injected into rabbits (Charles River Laboratories or NeoMPS; [21]) to raise, respectively, the Irp76Ab, Crp76Ab and Nhp76Ab antisera.

hp76Ab and Nhp76Ab react against human p76 only. Irp76Ab reacts against mouse and rat p76. Crp76Ab reacts against the three species. As purification did not improve the reactivity or the specificity of the antisera, the antibodies were used without purification. Non-immune sera did not reveal any significant protein species.

### Electrophoresis, Western blotting and MPR overlay

SDS/PAGE separation of the reduced proteins and 2DE (2-dimensional electrophoresis) were performed as described previously [7,22]. Proteins were stained by silver nitrate or Colloidal Blue (Bio Safe; Bio-Rad Laboratories). Western blot analyses [21] were performed with the following primary antibodies: (i) rabbit polyclonal antibodies: hp76Ab (diluted 1:1000), Nhp76Ab (diluted 1:500), Crp76Ab (diluted 1:1000), Irp76Ab (diluted 1:400), anti-mitochondrial ATPase (anti-F<sub>0</sub> subunit) (diluted 1:3000; a generous gift of Drs A. Dupuis and J. Lunardi, CEA-Grenoble, Grenoble, France); (ii) mouse monoclonal anti-LAMP1 (lysosomal-associated membrane protein 1; diluted 1:500; 1D4B, Developmental Studies Hybridoma Bank); and (iii) goat polyclonal anti-mouse CD98, (diluted 1:200; M-20, Santa Cruz Biotechnology). Membranes were then incubated with HRP (horseradish peroxidase)-conjugated secondary antibodies: goat anti-rabbit (diluted 1:50 000; Pierce), goat anti-mouse (diluted 1:3000, Bio-Rad Laboratories), or mouse anti-goat (diluted 1:10 000; Sigma–Aldrich). Signal detection was performed using the SuperSignal West Pico chemiluminescent substrate (Pierce) and exposure to X-ray film.

MPR overlay assays were adapted from Valenzano et al. [23]. sCI-MPR (soluble cation-independent-MPR, purified as described in [6]) was biotinylated using the Biotin Protein Labelling Kit (Roche), according to the manufacturer's protocol. 2DE-resolved Man6P proteins were electro-transferred onto nitrocellulose membranes (Bio-Rad Laboratories) that were blocked in TBST (Tris buffered saline containing 0.1% Tween-20) containing 3% (w/v) BSA and then incubated with biotinylated sCI-MPR in TBST and 1% (w/v) BSA with or without Man6P (Sigma–Aldrich), and then with neutravidin-HRP (diluted 1:75 000; Pierce) in TBST and 1% BSA. Bound biotinylated sCI-MPR was

revealed using the SuperSignal West Pico chemiluminescent substrate (Pierce) and exposure to X-ray film.

### Production and purification of Man6P proteins from cell lines or mouse brains

Man6P proteins were produced and purified from U937, Rat2, JR11 and 293/hp76–Myc cells as described [6]. Purification was performed either on an Affigel-10–sCI-MPR column or on sCI-MPR immobilized on Epoxy membranes (Sartorius).

Mouse brains were homogenized and Man6P proteins were affinity purified, as described previously [14], on sCI-MPR immobilized on an Epoxy membrane (Sartorius).

### Carbohydrate modification analysis

Purified U937 Man6P proteins were deglycosylated by PNGase F (peptide-*N*-glycosidase F; E.C. 3.5.1.52; Roche), according to the manufacturer's instructions. The reaction was stopped by the addition of Laemmli sample buffer [22], or by boiling. In the latter case, proteins were concentrated on Strataclean beads (Stratagene) and eluted by boiling in Laemmli sample buffer prior to Western blot analysis.

### Immunofluorescence studies

Transiently transfected HeLa cells were processed for immunofluorescence [21] 4 days after transfection. Cells were fixed at room temperature (25 °C) in methanol/acetone (50:50, v/v) chilled previously at –20 °C. Antibodies were used at the following dilutions: rabbit polyclonal Crp76Ab, 1:40; mouse monoclonal anti-human LAMP1, 1:1000 (CD107a, BD PharMingen); goat polyclonal anti-human cathepsin D, 1:25 (R-20, Santa Cruz Biotechnology); Cy3-conjugated goat anti-rabbit, 1:1500 (Jackson); AlexaFluor® 488-conjugated goat anti-mouse, 1:1000 (Molecular Probes); FITC-conjugated donkey anti-goat, 1:200 (Serotec). Fluorescence was examined using a TSC-SP2 confocal laser-scanning microscope (Leica).

### Sub-cellular fractionation and osmotic release experiments

Livers were obtained from female adult NMRI mice (20 g) that received, when specified, an intravenous injection of 17 mg of Triton WR-1339 (tyloxapol; Sigma–Aldrich) 4 days prior to sacrifice. Fractionation of sub-cellular organelles by differential centrifugation was performed according to [24]. Isopycnic centrifugation was carried out on the total mitochondrial ML fraction (heavy and light mitochondrial fractions from density gradient fractionation) as described previously [25].

For osmotic release experiments, an ML fraction from NMRI mouse liver was diluted in sucrose solutions of decreasing concentrations and analysed as described previously [26].

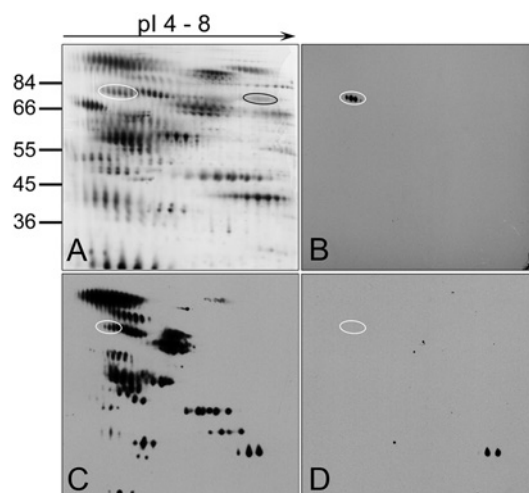
### Enzymatic assays

The activities of  $\beta$ -galactosidase,  $\beta$ -hexosaminidase and  $\beta$ -glucuronidase were measured as described previously [27].

## RESULTS

### Identification of a novel human protein among Man6P proteins: p76 (hypothetical protein LOC196463)

Our previous proteomic analysis of purified Man6P proteins from U937 and MCF7 human cells revealed a few novel proteins such



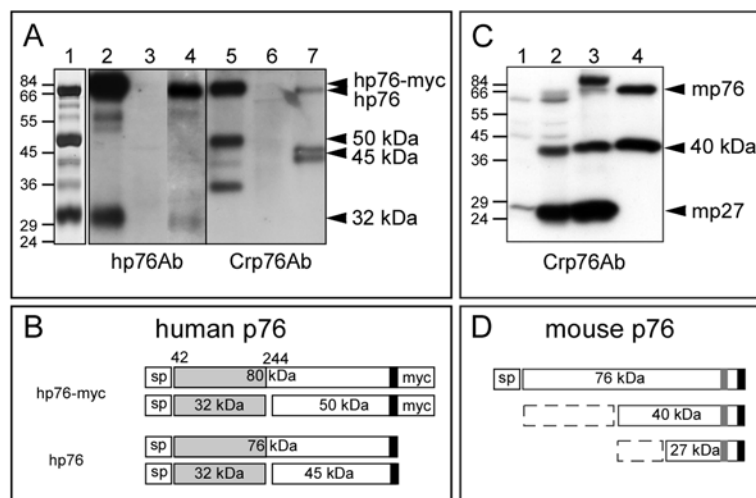
**Figure 1** Identification of hp76 as a Man6P protein

(A) Man6P proteins purified from  $2.5 \times 10^9$  U937 cells were resolved by 2DE over a 4–8 linear pH range on an SDS/10% (v/v) PAGE gel ( $20 \times 20$  cm) before Colloidal Blue staining (modified from [7] with permission). (B–D) Man6P proteins purified from  $2 \times 10^8$  U937 cells were resolved by 2DE over a 4–8 linear pH range on an SDS/10% (v/v) PAGE minigel ( $9 \times 9$  cm), transferred onto nitrocellulose membranes and probed with hp76Ab (B) or with 3.3 nM of biotinylated sCI-MPR without (C) or with (D) 5 mM Man6P. The spots inside the white ovals show the main series of hp76 spots; the black oval shows the position of the minor series of hp76-containing spots, which could only be detected with high protein amounts. Positions of molecular-mass markers (kDa) are shown to the left-hand side of (A).

as cystatin F and CREG (cellular repressor of E1A-stimulated genes) [6,7]. A novel protein, which was not mentioned in the previous papers, was initially identified on a 2DE gel from a U937 sample, in a series of spots of neutral to alkaline pI (approx. pH 7–8) and at a molecular mass of 70 kDa by a unique tandem MS peptide sequence (LASDGATWADIFK; residues 355–367 of LOC196463). These spots were barely detected by Colloidal Blue staining (Figure 1A) and were not visible in MCF7 extracts run on 2DE gels. The same protein was also identified in both U937 and MCF7 samples from a series of spots of more acidic pI (approx. pH 5), which migrated at a slightly higher molecular mass of 76 kDa (Figure 1A and see Supplementary Table 2 at <http://www.BiochemJ.org/bj/402/bj4020449add.htm>). We named it 'hp76', due to its apparent molecular mass. In the U937 sample, two peptides were identified by LC-MS/MS. In the MCF7 sample, 11 peptides of hp76 were identified by MALDI-TOF-MS fingerprinting, leading to a sequence coverage of 20%. Complementary analyses performed by LC-MS/MS on both U937 and MCF7 samples separated by SDS/PAGE led to the identification of seven tryptic peptides of hp76 in the U937 sample, and nine peptides in the MCF7 sample (respective coverages 13 and 17%; see Supplementary Table 2).

This novel protein, reported in the NCBI protein database as the 'hypothetical protein LOC196463', is 589 amino acids in length with a predicted signal peptide of 41 amino acids (see Supplementary Figure S1 at <http://www.BiochemJ.org/bj/402/bj4020449add.htm>). Since six potential *N*-glycosylation sites have been predicted for this protein, carbohydrate modifications are likely to explain the difference between the apparent and predicted molecular masses of the secreted protein, i.e. 76 and 61 kDa respectively.

hp76 appears to be evolutionarily conserved, as proteins exhibiting high amino-acid sequence similarity are found in several mammals and other species, namely *Caenorhabditis elegans*, *Dictyostelium discoideum* and *Trypanosoma brucei*



**Figure 2** Human and mouse p76 maturation

(A) Characterization of hp76-derived polypeptides. Protein samples were loaded onto a SDS/12% (v/v) PAGE gel and either Silver-stained (lane 1) or transferred for Western blot analysis with hp76Ab (lanes 2–4) or with Crp76Ab (lanes 5–7). Lane 1, Man6P proteins purified from 293/hp76–Myc supernatant; lanes 2 and 5, 293/hp76–Myc supernatant; lanes 3 and 6, 293/mock supernatant; lanes 4 and 7, Man6P proteins purified from U937 cells. Lane 4 is overexposed compared with the other lanes. (B) Hypothetical maturation scheme for hp76. hp76Ab targets epitopes in the N-terminal part of hp76 (light grey). Crp76Ab targets the C-terminal peptide of hp76 (black). (C) Characterization of mouse p76-derived polypeptides. Protein samples were loaded onto a SDS/12% (v/v) PAGE gel and transferred for Western blot analysis with Crp76Ab. Lane 1, untransfected HeLa cell lysate; lane 2, lysate of HeLa cells transfected with wild-type mp76 cDNA; lane 3, purified mouse brain Man6P proteins; lane 4, purified JR11 Man6P proteins. (D) Hypothetical maturation scheme for mp76. Crp76Ab targets the C-terminal peptide of rat and mouse p76 (black). lrp76Ab targets an internal peptide of rat and mouse p76 (dark grey).

(see Supplementary Table 3 at <http://www.BiochemJ.org/bj/402/bj4020449add.htm>). However, no similar protein is found in yeast. All these proteins are members of a family, based on the presence of a Laminin A domain. The name Laminin A domain probably originates from the organ where the first p76 encoding gene was identified, namely in the *Drosophila* 'lamina' glia [14,28]. The human and rodent p76 proteins are highly similar (see Supplementary Figure 1). The mouse hypothetical protein LOC71772 is 594 amino acids long and shares 82% sequence identity and 91% similarity with hp76 over a 558 amino acid alignment, whereas the rat hypothetical protein LOC246120 (Ensembl peptide ID ENSRNOP0000001872) is 585 amino acids long and shares 82% sequence identity and 92% similarity with hp76 over a 547 amino acid alignment. The similar protein expressed in the amoeba *D. discoideum* is of particular interest, because it is the only one for which a function (phospholipase B) has been so far demonstrated *in vitro* [28].

### Expression of hp76 in human tissues

The *loc196463* gene is located on the long arm of chromosome 12 (12q24.13) and is predicted to contain 12 exons generating a transcript of 2584 bp. The sequence of the corresponding cDNA (BC030618) is composed of a 28 bp 5'-UTR (untranslated region), a 1767 bp open reading frame and a 789 bp 3'-UTR containing a polyadenylation signal and a short poly(A) stretch.

Northern blotting (see Supplementary Figure 2 at <http://www.BiochemJ.org/bj/402/bj4020449add.htm>) showed that a transcript migrating at 2.4 kb, consistent with the hp76 cDNA length, was found in all tissues studied, with significantly higher expression in heart, brain and liver. The ubiquitous expression correlates well with the transcriptomic data provided by the SymAtlas website. Two additional transcripts were observed, a longer one of 4.4 kb, whose expression roughly follows that of the 2.4 kb transcript and a shorter one of 0.24 kb only detected in the liver. The origin of these two additional transcripts is unknown.

### Characterization of human and mouse p76 maturation fragments

#### Human p76

As recombinant hp76–Myc is secreted in large amounts by 293-EBNA cells transfected with pCEP4-hp76–Myc–His (293/hp76–Myc cells), we used this model for initial analysis of hp76 maturation. Comparison by SDS/PAGE of protein profiles of culture supernatants from mock-transfected 293-EBNA cells (results not shown) and 293/hp76–Myc cells showed that three major hp76–Myc-related polypeptides were secreted (Figure 2A, lane 1). N-terminal sequencing of the largest (80 kDa) form indicated that it corresponded to the hp76–Myc precursor, after cleavage of its signal peptide between positions 41 and 42 as predicted (see Supplementary Table 4 at <http://www.BiochemJ.org/bj/402/bj4020449add.htm>). Edman analysis of the 32 kDa species identified position 42 at its N-terminus, indicating that this fragment is in the N-terminal half of the protein (Figure 2B and Supplementary Table 4). As for the 50 kDa fragment, it starts at position 244 of the pre-protein (Figure 2B and Supplementary Table 4). Western blot analysis of the 293/hp76–Myc supernatant with hp76Ab, an antibody raised against the recombinant FLAG–hp76 protein, revealed the 80 kDa and the 32 kDa bands, but not the 50 kDa one (Figure 2A, lane 2). Thus, hp76Ab targets hp76 N-terminal epitopes only. The same sample was then analysed with Crp76Ab, an antibody that specifically recognises the C-terminus of rodent p76 and cross-reacts with human p76. Crp76Ab revealed the 80 kDa precursor and the 50 kDa fragment, but not the 32 kDa N-terminal one (Figure 2A, lane 5), indicating that the 50 kDa fragment is C-terminal. Other polypeptides at 40 kDa and 35 kDa were also revealed and these might be additional C-terminal fragments generated through limited proteolysis. These fragments could also be seen in the silver-stained gel (Figure 2A, lane 1). Among U937 Man6P proteins, hp76Ab detected a strong band at 76 kDa as well as a faint band at 32 kDa (Figure 2A, lane 4), whereas Crp76Ab detected the same 76 kDa band and a 45 kDa doublet (Figure 2A, lane 7).

Therefore, in both our models, that is the U937 Man6P proteins and 293/hp76–Myc secreted proteins, the hp76 precursor seems to be matured by a cleavage event occurring after signal peptide cleavage (Figure 2B). An N-terminal 32 kDa fragment is produced identically from hp76 or hp76–Myc, whereas the C-terminal fragment appears as a doublet of 45 kDa from U937 Man6P proteins or as a unique 50 kDa polypeptide in 293/hp76–Myc secretions. The presence of the Myc tag on hp76–Myc explains the difference in migration observed between the hp76 precursors (76 kDa compared with 80 kDa) and between the C-terminal polypeptides (45 kDa compared with 50 kDa) from U937 or 293/hp76–Myc samples respectively.

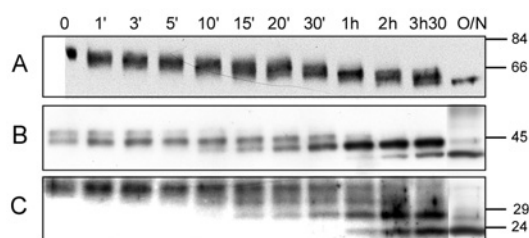
#### Mouse p76

Rat and mouse p76 proteins were analysed by immunoblotting and detected with Crp76Ab and Irp76Ab, two antibodies that recognise both rat and mouse p76. They were raised against different peptides of the rat p76 sequence, targeting the last 16 C-terminal residues and an internal peptide located in the C-terminal part of the protein respectively. Western blot analysis of lysates of HeLa cells overexpressing mp76 allowed us to visualize three major bands migrating at 76 kDa, 40 kDa and 27 kDa (Figure 2C, lanes 1 and 2). These same polypeptides were detected in Man6P proteins purified from rat (results not shown) or mouse brain (Figure 2C, lane 3), although the 76 kDa precursor was present as a minor species. In Man6P proteins purified from secretions from a rat cell line, Rat2 (results not shown), or from a mouse cell line, JR11 [19], only the 76 kDa and 40 kDa polypeptides were detected (Figure 2C, lane 4). The presence of an additional 27 kDa p76 polypeptide fragment in the HeLa cell lysate and the brain samples is probably due to an additional maturation event occurring only inside the cell. As the antibodies target C-terminal peptides, the 40 kDa and 27 kDa polypeptides are C-terminal fragments of the 76 kDa precursor. The 40 kDa polypeptide, which is probably the equivalent of the 45 kDa doublet observed for human p76, must be cleaved to generate a major intracellular 27 kDa fragment. This 27 kDa fragment will now be referred to as mp27 (Figure 2D).

#### hp76 precursor glycosylation

All potential glycosylation sites are glycosylated

To determine the actual number of occupied *N*-glycosylation sites, endogenous Man6P proteins purified from U937 cells were subjected to a time-course deglycosylation by PNGase F and subsequently analysed by Western blotting using three anti-p76 antibodies, the hp76Ab and Crp76Ab antibodies mentioned previously and Nhp76Ab, an antibody raised against the N-terminal peptide of hp76. Several bands of decreasing molecular masses ranging from 76 kDa to approx. 60 kDa were progressively produced (Figure 3A). Progressive deglycosylation of the 45 kDa C-terminal doublet gave rise to two additional bands with lower molecular masses, with the fully deglycosylated polypeptide migrating at 38 kDa (Figure 3B). Therefore, the initial doublet probably represents di-glycosylated and tri-glycosylated forms of the 38 kDa fragment, which were present in approximately equivalent amounts in U937 Man6P protein populations. Similarly, deglycosylation of the 32 kDa N-terminal fragment produced three additional species with decreasing molecular masses, indicating the presence of three glycosylation sites on the 22 kDa polypeptide backbone (Figure 3C). Taken together, these results indicate that all six predicted hp76 *N*-glycosylation sites are actually glycosylated.



**Figure 3** *N*-Glycosylation of hp76

Man6P proteins from U937 cells were subjected to deglycosylation by PNGase F for the indicated times, and resolved by SDS/PAGE using 7.5% (v/v; **A**; equivalent of  $6 \times 10^6$  cells/lane) or 9% (v/v; **B** and **C**; equivalent of  $30 \times 10^6$  cells/lane) gels and transferred for Western blot analysis. Additional PNGase F was added for maximal deglycosylation for the overnight (O/N) time points in (**B**) and (**C**), which were analysed on a separate Western blot. The precursor was detected with hp76Ab (**A**), the C-terminal fragment with Crp76Ab (**B**) and the N-terminal fragment with Nhp76Ab (**C**).

p76 is a Man6P protein

Although the specificity of the purification procedure has been demonstrated previously [6], some proteins might be indirectly trapped on the affinity column through their association with a Man6P protein, rather than being Man6P-labelled themselves. To address this question for hp76, we performed a biotinylated sCI-MPR overlay assay on 2DE-resolved Man6P proteins in the presence or absence of free Man6P competition. As the hp76 spot positions had been established both by MS (Figure 1A and Supplementary Table 2) and Western blotting (Figure 1B), we could identify hp76 among the proteins recognised by the biotinylated sCI-MPR (Figure 1C). Addition of free Man6P competed with this labelling effectively (Figure 1D), thus confirming the specificity of the MPR–hp76 interaction. Therefore, hp76 is a Man6P protein, which interacts directly with the sCI-MPR on the affinity column.

#### Human and mouse p76 co-localize with lysosomal markers

As the presence of Man6P sugars on p76 suggested that p76 might be a lysosomal protein, its localization was first studied by immunofluorescence. In HeLa cells overexpressing hp76, hp76 was observed in vesicles concentrated in a perinuclear area, as well as dispersed throughout the cytoplasm (Figure 4). Double-staining with a lysosomal membrane marker, LAMP1, or a luminal lysosomal marker, cathepsin D, showed that hp76 co-localized with both of them to a large extent (Figure 4). A similar immunofluorescence study was carried out on HeLa cells overexpressing mouse p76, which gave the same results. The intracellular distribution of mp76 also consisted in a vesicular staining mainly co-localizing with lysosomal markers, as determined by cathepsin D or LAMP1 co-labelling (results not shown).

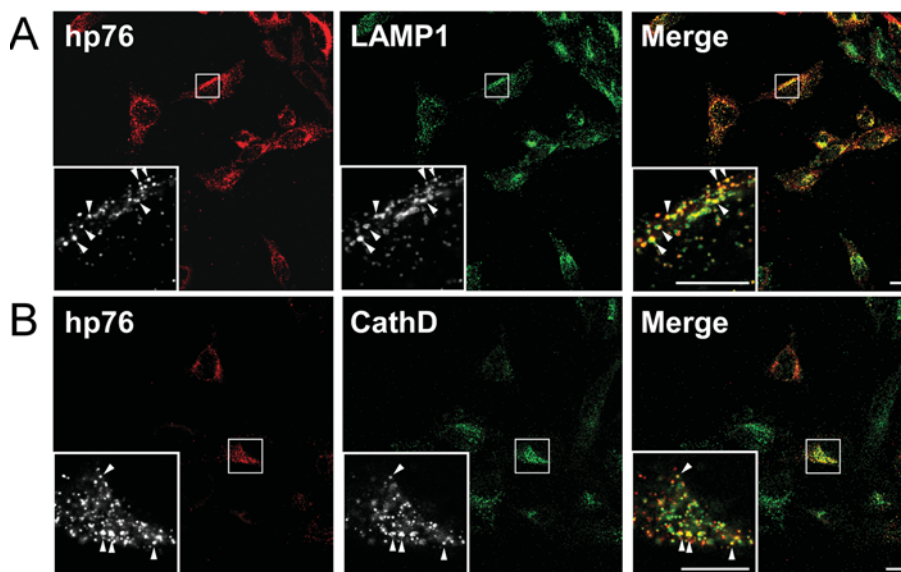
#### Sub-cellular fractionation shows a lysosomal distribution for mp27, the 27 kDa C-terminal polypeptide fragment of matured mp76

The sub-cellular localization of endogenous p76 was established by determining the distribution of mp27 (Figure 2D) in fractions obtained by sub-cellular fractionation of liver homogenates [29]. Experiments were performed on both rat and mouse samples. As we obtained similar results for both species, only the experiments carried out on mouse samples are presented here.

#### Differential centrifugation

Differential centrifugation of mouse liver homogenates was performed to separate nuclear (N), heavy mitochondrial (M), light





**Figure 4** Co-localization of hp76 with lysosomal markers

HeLa cells were transfected with wild-type hp76 cDNA. At 72 h post-transfection, cells were fixed and double-immunolabelled for hp76 (with Crp76Ab; red) and (A) LAMP1 (green) or (B) cathepsin D (CathD; green). Arrowheads denote some vesicles that are positive for both types of staining. Scale bars, 10  $\mu$ m.

mitochondrial (L), microsomal (P) and soluble (S) fractions [24]. As shown in Figure 5(A), the distribution of mp27, LAMP1, mitochondrial ATPase  $F_0$  subunit and CD98 were determined by Western blotting or by enzymatic assays for  $\beta$ -galactosidase and  $\beta$ -hexosaminidase. For Western blot analysis, the same quantity of proteins was loaded onto each lane of the gel and thus the intensity of the signal revealed after immunoblotting corresponds to the relative enrichment of the protein in each fraction. For enzymatic assays,  $\beta$ -galactosidase and  $\beta$ -hexosaminidase activities are represented as proposed by de Duve et al. [24]: bar height (specific activity) is indicative of the lysosome purification in the nuclear, heavy mitochondrial, light mitochondrial, microsomal and soluble fractions. As shown in Figure 5(A), a strong mp27 signal was detected in the total mitochondrial fraction (heavy and light), with the strongest signal in the light fraction. This pattern is highly indicative of liver lysosomes, as shown by the distribution of LAMP1 and lysosomal enzymes. It should be noted that a 29 kDa fragment was also detected with Crp76Ab in all fractions (Figure 5A). Although this signal is not detected by the non-immune serum (results not shown), we assume that it is not related to mp76 because, (i) Irp76Ab does not reveal this 29 kDa band in those fractions (results not shown), and (ii) Crp76Ab and Irp76Ab do not detect this band in either HeLa cells overexpressing mp76 or in mouse brain purified Man6P proteins (Figure 2C). The distribution of the mitochondrial ATPase  $F_0$  subunit (strongest signal in the mitochondrial heavy fraction) and the plasma membrane protein CD98 (in nuclear and microsomal fractions) agreed with the distribution of these sub-cellular compartments from liver samples reported previously [24]. These patterns were clearly distinct from those of the lysosomal markers.

#### Density gradient fractionation

An ML fraction was prepared and analysed further by isopycnic centrifugation on a linear sucrose-density gradient. Lysosomes, represented by  $\beta$ -galactosidase and  $\beta$ -hexosaminidase activity, equilibrated in the heavy fractions of the gradient (Figure 5B). mp27 was detected in the same fractions as these lysosomal mark-

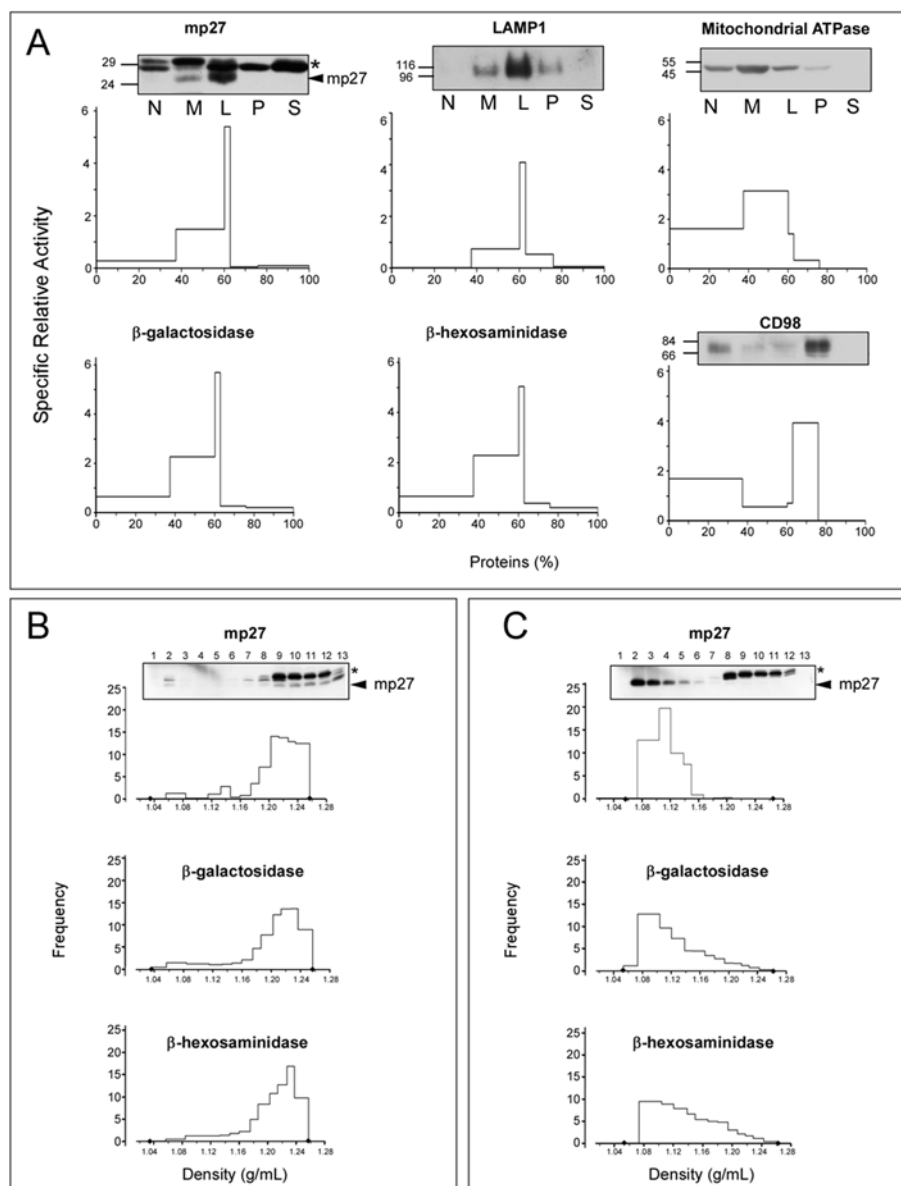
ers. However, to assess the significance of this co-distribution, lysosomes were submitted to a density shift experiment. We injected mice with a non-haemolytic detergent, Triton WR 1339, that specifically accumulates in lysosomes and strongly reduces their density [30]. As shown in Figure 5(C), mp27 accompanied the shift of the lysosomes toward the low densities of the gradient after this treatment, providing strong evidence for mp27 residence in lysosomes.

#### Osmotic release of mp27

We studied the sensitivity of mp27-containing vesicles to a hypo-osmotic treatment [26] and compared the release of mp27 with that of known lysosomal markers. Aliquots of an ML fraction were incubated in decreasing sucrose concentration. As shown in Figure 6, the osmotic release curve of the luminal lysosomal hydrolases  $\beta$ -galactosidase,  $\beta$ -hexosaminidase and  $\beta$ -glucuronidase was similar to that of mp27. This result is therefore consistent with mp27 being a soluble polypeptide present in the lysosome. Conversely, the non-specific 29 kDa signal mentioned above (see the Differential centrifugation subsection) was never released from the membrane fraction.

## DISCUSSION

During the course of our proteomic analyses of Man6P proteins [6,7], a novel protein was identified in two human cell lines, U937 and MCF7. This protein migrated mainly at an apparent molecular mass of 76 kDa, which led us to name it p76. While we were carrying out the experiments of the present paper, hp76 appeared in the NCBI protein database as the hypothetical protein LOC196463, and the human and murine p76 proteins were identified in proteomic analyses of similarly affinity-purified Man6P proteins from human brain extracts and from mouse cell culture supernatants respectively [8,14]. In the latter study, murine p76 was named '66.3 kDa protein'. p76 was also identified in a proteomic analysis of purified neuromelanin granules from human brain



**Figure 5** Distribution of mp27 in mouse liver sub-cellular fractions

**(A)** Differential centrifugation of mouse liver. The distribution of various markers and mp27 was analysed either by Western blotting (mp27, LAMP1, mitochondrial ATPase and CD98) and quantified using the NIH (National Institutes of Health) Image software or by enzymatic activity measurement ( $\beta$ -galactosidase and  $\beta$ -hexosaminidase). Fractions correspond to nuclear (N), heavy mitochondrial (M), light mitochondrial (L), microsomal (P) and soluble (S) fractions. Equal amounts of proteins (40  $\mu$ g) were loaded for each fraction onto an SDS/10% (v/v) PAGE gel and transferred for Western blot analysis. mp27 was detected by Crp76Ab. For all graphs, the ordinate is the relative specific activity or intensity and the abscissa is the relative protein content plotted cumulatively from left to right. Asterisk (\*), non-specific band. **(B and C)** Distribution of mp27,  $\beta$ -galactosidase and  $\beta$ -hexosaminidase after isopycnic centrifugation in a linear sucrose density gradient. ML fractions were prepared from liver homogenates of non-treated **(B)** or Triton WR-1339-injected **(C)** mice. The sucrose density gradient was cut into 13 fractions from low to high density. Equal volumes of each fraction were loaded onto an SDS/12% (v/v) PAGE gel and transferred for Western blot analysis of mp27 with Crp76Ab. Distributions of  $\beta$ -galactosidase and  $\beta$ -hexosaminidase were determined by enzymatic assays on each fraction. Histograms represent the frequency (percentage of activity or intensity divided by the increment of density) as a function of the density. Asterisk (\*), non-specific band.

[31]. hp76 is a 589-residue protein with a putative 41-amino-acid signal peptide and six potential glycosylation sites.

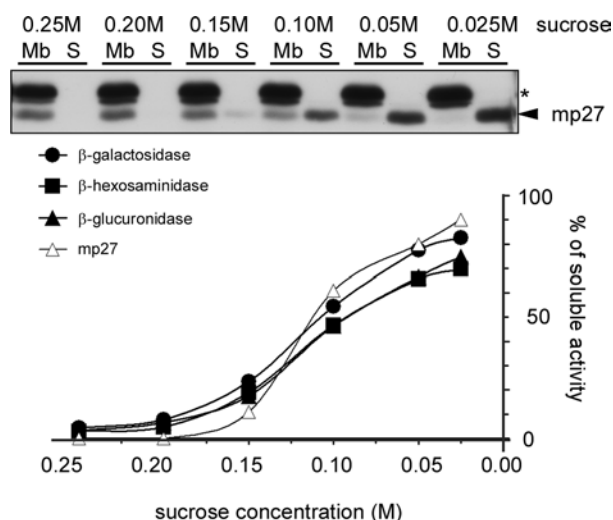
#### All potential glycosylation sites of hp76 are glycosylated, and some of them are effectively mannose-6-phosphorylated

The extent of hp76 glycosylations was determined on U937 Man6P proteins and we unambiguously showed that all six potential hp76 glycosylation sites were occupied. Some glycosylation heterogeneity was observed, residing on any one of the resi-

dues at the following three positions 436, 465 or 515. Such heterogeneous glycosylation events are common among Man6P proteins [32]. However, in a recent global proteomic study, which aimed at listing the mannose-6-phosphorylated glycopeptides of purified brain Man6P proteins from both human and mouse origin, Sleat et al. [15] did not observe heterogeneous glycosylation at any of these three positions. This discrepancy might be due to the respective p76 sources, i.e. brain Man6P proteins compared with Man6P proteins secreted from a monocytic cell line.

Since hp76 could have been purified on the MPR affinity column through association with a true Man6P-bearing protein,





**Figure 6** Osmotic release of mp27

Aliquots from a freshly prepared ML fraction were incubated for 15 min at 4°C in sucrose solutions ranging from 0.25 M to 0.025 M. Broken membranes and intact organelles were separated from released soluble proteins by ultracentrifugation. Pellets (Mb) and supernatant (S) proteins were separated on an SDS/12% (v/v) PAGE gel and transferred for Western blot analysis of mp27 with Crp76Ab. Enzymatic activities of lysosomal hydrolases  $\beta$ -galactosidase,  $\beta$ -hexosaminidase and  $\beta$ -glucuronidase were measured in each fraction. The ordinate (percentage of soluble activity or intensity) represents the ratio of the activity or intensity measured in the soluble fraction to the sum of the activities or intensities measured in the soluble and the membrane fractions. Asterisk (\*), non-specific band.

without being mannose-6-phosphorylated itself, we checked the Man6P status of hp76. We showed, unambiguously, a direct and Man6P-dependent interaction between hp76 and sCI-MPR, indicating that hp76 is a true Man6P protein. Our overlay results confirm the proteomic analysis published by Sleat et al. [15], who detected the presence of Man6P on five glycopeptides of brain hp76. This high number of Man6P glycopeptides in hp76 is interesting with regard to other known lysosomal Man6P proteins. Indeed, for the 43 known lysosomal proteins that were identified through their Man6P-glycopeptides, an average of two Man6P-glycopeptides was identified per protein. Only two hydrolases displayed five or more Man6P-glycopeptides: the acid ceramidase (five peptides) and the N-acetylglucosamine-6-sulfatase (nine peptides) [15]. The high number of Man6P in hp76 might have implications for the specificity of its recognition by the MPR and for its potential lysosomal targeting efficiency. Besides, this result might suggest that although the six hp76 glycosylation sites are occupied (as presented here), only five of them are mannose-6-phosphorylated. The *N*-glycosylation of residue 110 of hp76 could be of the complex type and therefore absent from the Man6P glycopeptides identified by Sleat et al. [15]. Differences in the sugar types borne by lysosomal proteins do exist, such as for human  $\beta$ -glucuronidase and human  $\beta$ -hexosaminidase B, which both have only two mannose-6-phosphorylated *N*-glycosylations out of their four *N*-glycosylated sites [33,34].

### Human and mouse p76 are subject to maturation

In secreted human Man6P proteins, we observed an N-terminal fragment of 32 kDa as well as a 45 kDa C-terminal doublet, both specific for hp76. The corresponding fragments were also observed in the secreted recombinant hp76-Myc protein. Their N-terminal sequencing identified the signal peptide cleavage site, between positions 41 and 42, in addition to an internal cleavage

site between position 243 and 244. In human brain Man6P proteins [14], hp76 was found in numerous spots in the 42–30 kDa molecular mass range. An N-terminal sequence starting at position 291 of hp76 was determined, indicating the presence of at least a C-terminal fragment in brain. Nonetheless, the 32 kDa N-terminal chain might also be present in these spots. The two different N-terminal sequences obtained for the C-terminal fragment might be due to different proteolytic events occurring for the respective proteins, i.e. the recombinant protein secreted from cells in culture (the present paper) compared with the intracellular proteins from brain [14].

In Man6P proteins purified from mouse cell secretions, our antibodies allowed us to detect a 40 kDa mp76 C-terminal fragment. Intracellularly, this 40 kDa fragment appeared to be further processed, since an extra 27 kDa C-terminal fragment (mp27) was detected in mp76 cDNA transfected cell lysates, in the enriched ML fraction from mouse liver, and in mouse brain Man6P proteins. As the 40 kDa mp76 fragment was detected in cell secretions, the first proteolytic mp76 cleavage is likely to occur before segregation of lysosomal enzymes from the secretory pathway. The cleavage event responsible for mp27 formation would happen once the 40 kDa fragment is engaged in the endocytic pathway. In a proteomic study of secreted mouse Man6P proteins [8], mp76 was found on a 2DE gel in a series of three spots, migrating at molecular masses of 66 kDa, 40 kDa and 30 kDa. These species might correspond to the precursor, the C-terminal and the N-terminal fragments respectively. The difference in the apparent molecular masses of the p76 precursor (76 kDa compared with 66 kDa) in the present paper and in the paper by Kollmann et al. [8] might be due to lower mp76 glycosylation or differences in the respective electrophoresis gels and standards.

Maturation events of this type are not uncommon for lysosomal proteins. The human 53 kDa cathepsin D or the 85 kDa  $\beta$ -galactosidase precursors are processed proteolytically so that the mature forms are heterodimers composed of a heavy and a light chain in lysosomes [35,36]. Conversely, human  $\beta$ -glucuronidase loses a small C-terminal peptide upon maturation [37]. In conclusion, we propose that the 76 kDa p76 precursor is cleaved into a 32/30 kDa N-terminal polypeptide and a 45/40 kDa C-terminal polypeptide (human compared with mouse; the present study and [8]). Intracellularly, a further cleavage would occur in the C-terminal chain, at least for the rat and mouse proteins, generating mp27.

### p76 is a lysosomal protein

Proteins bearing Man6P glycosylations are mainly soluble lysosomal proteins, despite the known existence of a few non-lysosomal Man6P proteins [38–43]. Nonetheless, the recent identification of numerous non-lysosomal Man6P proteins in plasma weakened this idea [11]. This finding reinforces the necessity to experimentally assess the sub-cellular localization of any newly identified Man6P protein. Accordingly, Sleat et al. [11] defined three criteria to select new candidate lysosomal proteins: (i) enrichment of proteins by MPR purification cycles; (ii) low abundance in plasma; and (iii) predicted or known function compatible with a lysosomal localization. Hence, of the 44 Man6P proteins that were identified in the cytoplasm and that were not known to be lysosomal, nine candidates were selected, among which was hp76 [11]. On the other hand, the identification of hp76 in a proteomic analysis of neuromelanin granules from human brain also supported the hypothesis that p76 could be a lysosomal protein [31]. Indeed, it was demonstrated that neuromelanin granules belonged to the lysosome-like organelles family [31]. Moreover, Kollmann et al. [8] have shown that purified recombinant

mp76 was internalized via MPR-mediated endocytosis, providing another argument in favour of a lysosomal localization of p76.

To determine p76 sub-cellular localization, we first used immunofluorescence on cells overexpressing either human or mouse p76, and showed a clear co-localization of p76 with the lysosomal markers LAMP1 and cathepsin D. To analyse the sub-cellular localization of endogenous p76, we performed biochemical studies on rat and mouse liver samples, in which p76 was detected as the mp27 matured polypeptide. The similar behaviour of mp27 and lysosomal marker proteins in sub-cellular fractionation experiments (differential centrifugation, isopycnic centrifugation of ML fractions on linear sucrose density gradients, with or without a specific reduction of the lysosome density), and in osmotic release experiments strongly indicates residence of p76 in lysosomes. Taken together, these results give very strong evidence for p76 being a lysosomal protein.

### Concluding remarks

Now that the lysosomal localization of p76 has been clearly assessed, the next step will be to determine its function. As the only protein displaying significant sequence similarity with p76 and for which a function has been experimentally demonstrated is a *D. discoideum* phospholipase B [28], we are setting up functional assays for the analysis of the putative phospholipid degradation by p76. As little is known about phospholipid catabolism, the identification of p76 as a novel lysosomal phospholipase and the analysis of the possible effects of a deficiency in this protein would be an important contribution to lysosome comprehension.

We are grateful to Dr D. Grünwald [CEA (Commissariat à l'Energie Atomique)-Grenoble, Grenoble, France] for help and guidance with confocal microscopy, Professor B. Hoflack (Technical University of Dresden, Germany) for the kind gift of JR11 cells, Dr A. Dupuis for helpful discussions and Dr M. Gallagher-Gambarelli (both from CEA-Grenoble, Grenoble, France) for reading of the manuscript. This work was supported by the INSERM, the Life Sciences Division of the CEA, the Joseph Fourier University and the Fonds de la Recherche Fondamentale Collective (Contract no. 2.4505.01). A. G. J. and M. C. are recipients of fellowships from the CEA.

Note: While the present paper was under revision, a study has been published on the mouse p76 (66.3 kDa protein; [44]). The experimental data presented in this publication complement our own work and strongly support our conclusions.

### REFERENCES

- 1 Futerman, A. H. and van Meer, G. (2004) The cell biology of lysosomal storage disorders. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**, 554–565
- 2 Li, P., Gregg, J. L., Wang, N., Zhou, D., O'Donnell, P., Blum, J. S. and Croizer, V. L. (2005) Compartmentalization of class II antigen presentation: contribution of cytoplasmic and endosomal processing. *Immunol. Rev.* **207**, 206–217
- 3 Kroemer, G. and Jäätelä, M. (2005) Lysosomes and autophagy in cell death control. *Nat. Rev. Cancer* **5**, 886–897
- 4 Hille-Rehfeld, A. (1995) Mannose 6-phosphate receptors in sorting and transport of lysosomal enzymes. *Biochim. Biophys. Acta* **1241**, 177–194
- 5 Einstein, R. and Gabel, C. A. (1989) Serum factors alter the extent of dephosphorylation of ligands endocytosed via the mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor. *J. Cell Biol.* **109**, 1037–1046
- 6 Journet, A., Chapel, A., Kieffer, S., Louwagie, M., Luche, S. and Garin, J. (2000) Towards a human repertoire of monocytic lysosomal proteins. *Electrophoresis* **21**, 3411–3419
- 7 Journet, A., Chapel, A., Kieffer, S., Roux, F. and Garin, J. (2002) Proteomic analysis of human lysosomes: application to monocytic and breast cancer cells. *Proteomics* **2**, 1026–1040
- 8 Kollmann, K., Mutenda, K. E., Balleininger, M., Eckermann, E., von Figura, K., Schmidt, B. and Lubke, T. (2005) Identification of novel lysosomal matrix proteins by proteome analysis. *Proteomics* **5**, 3966–3978
- 9 Czapalla, C., Mansukoski, H., Riedl, T., Thiel, D., Krause, E. and Hoflack, B. (2006) Proteomic analysis of lysosomal acid hydrolases secreted by osteoclasts: implications for lytic enzyme transport and bone metabolism. *Mol. Cell. Proteomics* **5**, 134–143
- 10 Sleat, D. E., Kraus, S. R., Sohar, I., Lackland, H. and Lobel, P. (1997)  $\alpha$ -Glucosidase and *N*-acetylglucosamine-6-sulphatase are the major mannose-6-phosphate glycoproteins in human urine. *Biochem. J.* **324**, 33–39
- 11 Sleat, D. E., Wang, Y., Sohar, I., Lackland, H., Li, Y., Li, H., Zheng, H. and Lobel, P. (2006) Identification and validation of mannose 6-phosphate glycoproteins in human plasma reveal a wide range of lysosomal and non-lysosomal proteins. *Mol. Cell. Proteomics* **5**, 1942–1956
- 12 Sleat, D. E., Chen, T. L., Raska, Jr, K. and Lobel, P. (1995) Increased levels of glycoproteins containing mannose 6-phosphate in human breast carcinomas. *Cancer Res.* **55**, 3424–3430
- 13 Sleat, D. E., Sohar, I., Lackland, H., Majercak, J. and Lobel, P. (1996) Rat brain contains high levels of mannose-6-phosphorylated glycoproteins including lysosomal enzymes and palmitoyl-protein thioesterase, an enzyme implicated in infantile neuronal lipofuscinosis. *J. Biol. Chem.* **271**, 19191–19198
- 14 Sleat, D. E., Lackland, H., Wang, Y., Sohar, I., Xiao, G., Li, H. and Lobel, P. (2005) The human brain mannose 6-phosphate glycoproteome: a complex mixture composed of multiple isoforms of many soluble lysosomal proteins. *Proteomics* **5**, 1520–1532
- 15 Sleat, D. E., Zheng, H., Qian, M. and Lobel, P. (2006) Identification of sites of mannose 6-phosphorylation on lysosomal proteins. *Mol. Cell. Proteomics* **5**, 686–701
- 16 Jadot, M., Lin, L., Sleat, D. E., Sohar, I., Hsu, M. S., Pintar, J., Dubois, F., Wattiaux-De Coninck, S., Wattiaux, R. and Lobel, P. (1999) Subcellular localization of mannose 6-phosphate glycoproteins in rat brain. *J. Biol. Chem.* **274**, 21104–21113
- 17 Saksouk, N., Bhatti, M. M., Kieffer, S., Smith, A. T., Musset, K., Garin, J., Sullivan, Jr, W. J., Cesbron-Delauw, M. F. and Hakimi, M. A. (2005) Histone-modifying complexes regulate gene expression pertinent to the differentiation of the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *Mol. Cell Biol.* **25**, 10301–10314
- 18 Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor
- 19 Ludwig, T., Munier-Lehmann, H., Bauer, U., Hollinshead, M., Ovitt, C., Lobel, P. and Hoflack, B. (1994) Differential sorting of lysosomal enzymes in mannose 6-phosphate receptor-deficient fibroblasts. *EMBO J.* **13**, 3430–3437
- 20 Chen, C. and Okayama, H. (1987) High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol. Cell Biol.* **7**, 2745–2752
- 21 Harlow, E. and Lane, D. (1988) *Antibodies: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY
- 22 Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685
- 23 Valenzano, K. J., Kallay, L. M. and Lobel, P. (1993) An assay to detect glycoproteins that contain mannose 6-phosphate. *Anal. Biochem.* **209**, 156–162
- 24 de Duve, C., Pressman, B. C., Gianetto, R., Wattiaux, R. and Appelmans, F. (1955) Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue. *Biochem. J.* **60**, 604–617
- 25 Beaufay, H., Jacques, P., Baudhuin, P., Sellinger, O. Z., Berthet, J. and de Duve, C. (1964) Tissue fractionation studies. 18. Resolution of mitochondrial fractions from rat liver into three distinct populations of cytoplasmic particles by means of density equilibration in various gradients. *Biochem. J.* **92**, 184–205
- 26 Appelmans, F. and de Duve, C. (1955) Tissue fractionation studies. 3. Further observations on the binding of acid phosphatase by rat-liver particles. *Biochem. J.* **59**, 426–433
- 27 Peters, T. J., Muller, M. and de Duve, C. (1972) Lysosomes of the arterial wall. I. Isolation and subcellular fractionation of cells from normal rabbit aorta. *J. Exp. Med.* **136**, 1117–1139
- 28 Morgan, C. P., Insall, R., Haynes, L. and Cockcroft, S. (2004) Identification of phospholipase B from *Dictyostelium discoideum* reveals a new lipase family present in mammals, flies and nematodes, but not yeast. *Biochem. J.* **382**, 441–449
- 29 Beaufay, H. (1972) In *Lysosomes: A Laboratory Handbook* (Dingle, J. T., ed.), pp. 1–44, North-Holland, Amsterdam
- 30 Wattiaux, R. and Wattiaux-de Coninck, S. (1967) Influence of the injection of "Triton WR-1339" on lysosomes of a rat transplantable hepatoma. *Nature* **216**, 1132–1133
- 31 Tribl, F., Gerlach, M., Marcus, K., Asan, E., Tatschner, T., Arzberger, T., Meyer, H. E., Bringmann, G. and Riederer, P. (2005) Subcellular proteomics of neuromelanin granules isolated from the human brain. *Mol. Cell. Proteomics* **4**, 945–957
- 32 von Figura, K. and Hasilik, A. (1986) Lysosomal enzymes and their receptors. *Annu. Rev. Biochem.* **55**, 167–193
- 33 Sonderfeld-Fresko, S. and Proia, R. L. (1989) Analysis of the glycosylation and phosphorylation of the lysosomal enzyme,  $\beta$ -hexosaminidase B, by site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.* **264**, 7692–7697
- 34 Shipley, J. M., Grubb, J. H. and Sly, W. S. (1993) The role of glycosylation and phosphorylation in the expression of active human  $\beta$ -glucuronidase. *J. Biol. Chem.* **268**, 12193–12198
- 35 Gieselmann, V., Pohlmann, R., Hasilik, A. and von Figura, K. (1983) Biosynthesis and transport of cathepsin D in cultured human fibroblasts. *J. Cell Biol.* **97**, 1–5

- 36 van der Spoel, A., Bonten, E. and d'Azzo, A. (2000) Processing of lysosomal  $\beta$ -galactosidase. The C-terminal precursor fragment is an essential domain of the mature enzyme. *J. Biol. Chem.* **275**, 10035–10040
- 37 Erickson, A. H. and Blobel, G. (1983) Carboxyl-terminal proteolytic processing during biosynthesis of the lysosomal enzymes  $\beta$ -glucuronidase and cathepsin D. *Biochemistry* **22**, 5201–5205
- 38 Faust, P. L., Chirgwin, J. M. and Kornfeld, S. (1987) Renin, a secretory glycoprotein, acquires phosphomannosyl residues. *J. Cell Biol.* **105**, 1947–1955
- 39 Herzog, V., Neumüller, W. and Holzmann, B. (1987) Thyroglobulin, the major and obligatory exportable protein of thyroid follicle cells, carries the lysosomal recognition marker mannose 6-phosphate. *EMBO J.* **6**, 555–560
- 40 Lee, S. J. and Nathans, D. (1988) Proliferin secreted by cultured cells binds to mannose 6-phosphate receptors. *J. Biol. Chem.* **263**, 3521–3527
- 41 Purchio, A. F., Cooper, J. A., Brunner, A. M., Lioubin, M. N., Gentry, L. E., Kovacina, K. S., Roth, R. A. and Marquardt, H. (1988) Identification of mannose 6-phosphate in two asparagine-linked sugar chains of recombinant transforming growth factor- $\beta$ 1 precursor. *J. Biol. Chem.* **263**, 14211–14215
- 42 Todderud, G. and Carpenter, G. (1988) Presence of mannose phosphate on the epidermal growth factor receptor in A-431 cells. *J. Biol. Chem.* **263**, 17893–17896
- 43 Cacia, J., Quan, C. P., Pai, R. and Frenz, J. (1998) Human DNase I contains mannose 6-phosphate and binds the cation-independent mannose 6-phosphate receptor. *Biochemistry* **37**, 15154–15161
- 44 Deuschl, F., Kollmann, K., von Figura, K. and Lubke, T. (2006) Molecular characterization of the hypothetical 66.3-kDa protein in mouse: lysosomal targeting, glycosylation, processing and tissue distribution. *FEBS Lett* **580**, 5747–5752

Received 7 August 2006/8 November 2006; accepted 15 November 2006

Published as BJ Immediate Publication 15 November 2006, doi:10.1042/BJ20061205